Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Zwei vergleichende Methoden zur Bestimmung des 2,3-Diphosphoglyceratgehaltes in menschlichen Erythrocyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helmtraud Schulze-Seyler, geb. Mutschler
aus Tübingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0104

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Zwei vergleichende Methoden zur Bestimmung des 2,3-Diphosphoglyceratgehaltes in menschlichen Erythrocyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helmtraud Schulze-Seyler, geb. Mutschler
aus Tübingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Mayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. G.W. Löhr
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.D. Waller

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	EINLEITUNG	
	I. Geschichtliches	1 - 11
	a) Die Entdeckung des Stoffes	1
	b) Seine Stellung in der Glykolyse dazu Abb: Schema der Glykolyse Intermolekulare Phosphatumlagerung von 2-PG zu 2,3-DPG (Karlson) Rapoport-Luebering-Zyklus	1
	c) Vorkommen des Stoffes	2
	d) Synthesen	3
	e) Besonderheiten des Stoffwechsels der Erythrozyten	3
	f) Bedeutung des 2,3-DPG für den Energiehaushalt des Erythrozyten	6
	g) Haemolysen durch Mangel an 2,3-DPG	6
	II. Bisherige Ergebnisse von 2,3-DPG-Bestimmungen	8
	dazu: Tab. der Werte für die bisher bekannten Fälle mit 2,3-DPG-Mangel	1o
B	METHODIK Zwei Methoden der 2,3-DPG-Bestimmung	
	I. Methode der elektrophoretischen Trennung und quan-	12 - 25

titativen Bestimmung mit Chromotropsäure nach Bartlett

1. Vorversuche 12 - 17
   a) Trennung der Glycerophosphate 12
   b) Nachweis der Zuckerphosphate nach Burrow 15
      dazu Abb:
      Bestimmung der Glycerophosphate 2-PG und 2,3-DPG mit Chromotropsäure nach Bartlett, ohne vorherige elektroph. Trennung.
      Bestimmung des 2,3-DPG mit Chromotropsäure
   c) Ergebnisse der Vorversuche 16

2. 3o Bestimmungen an Vollblutproben 17-25
   Arbeitsweise (a - i)
   a) Reagentien für die Hauptversuche 17
   b) Herstellen des Extraktes aus enteiweisstem Vollblut 18
   c) Hochspannungselektrophorese 19
   d) Lokalisation des 2,3-DPG 19
   e) Aufsuchen der Lokalisation im ungefärbten Mittelteil
   f) Elution und Trocknung 2o
      dazu (c - f) Abb:
      Elektrophoresepapier mit Anordnung der Auftragsstellen und Auf-

tragsubstanzen zu Maßstab 1:3
Plexiglasrahmen, zur Lokalisation
Elutionsverfahren, Schema
g) Kochbad 21
h) Messung und Berechnung 21
i) Tabelle der 3o,11 Werte in Mikromol/lo Erythrozyten 24
Mittelwert, Fehlerrechnung 25

II. Methode der enzymatischen Bestimmung von 2,3-DPG im Erythrozyten nach LÖHR 26 - 36

1. Testbasis, Testschema, Testansatz 26
2. Vorversuche
3. 3o Bestimmungen an Vollblutproben 28 - 34
a) Arbeitsweise 28
b) Berechnung 29
c) ein vollständig durchgeführtes Beispiel der Berechnung 31
d) Tabellen der Ergebnisse 33, 35
Berechnung des Mittelwertes, Fehlerrechnung 34, 36
dazu Abb.:
Abhängigkeit der PGM-Reaktion von definierten 2,3-DPG-Konzentrationen.
Abhängigkeit der PGM-Reaktion von 2,3-DPG-Konzentrat
Ionen in definierten Mengen Vollblut
Kurven zum enzymkinetischen Test 1 - 3o

C DISKUSSION 37 - 38

Erklärung 39

Zahlenteil 4o - 7o

Zu Abb.: Bestimmung der Glycerophosphate 2-PG und 2,3-DPG mit Chromotropsäure nach Bartlett 4o

Zu Abb.: Bestimmung des 2,3-DPG- nach Bartlett 41
a) ohne vorherige elektrophoretische Trennung
b) mit vorherige elektrophoretische Trennung 42

Zur PGM-Abhängigkeit von definierten 2,3-DPG-Konzentrationen 43 - 49

Zur PGM-Abhängigkeit von 2,3-DPG-Konzentrationen in definierten Mengen Vollblut 5o - 56

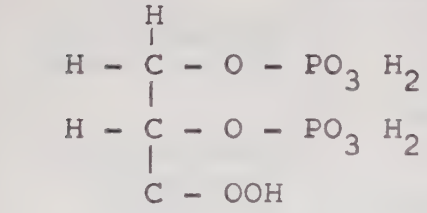
Zur Tabelle der Werte für den 2,3-DPG-Gehalt in 10^{11} Erythrozyten 56 - 7o

Literaturverzeichnis

E I N L E I T U N G

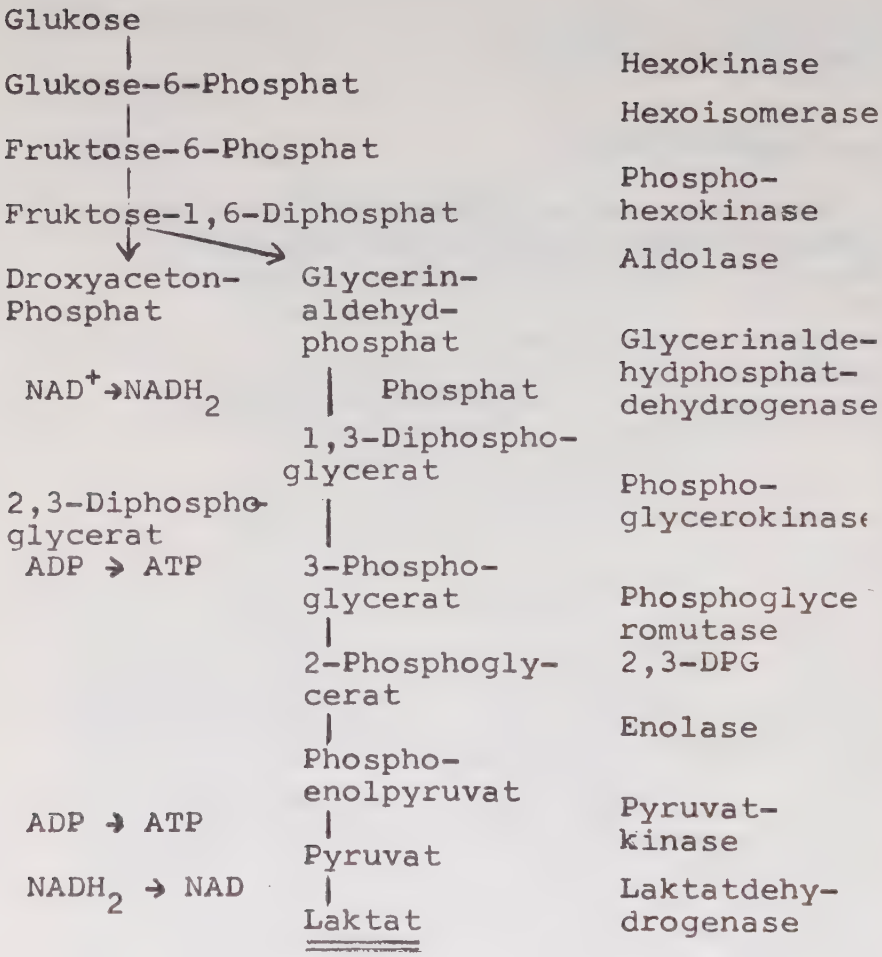
1. Geschichtliches

a) 1925 isolierte GREENWALD (18) aus Schweineerythrozyten eine organische Phosphorsäure, deren organischen Anteil er als Barium-2,3-Diglycerat erkannte.
Die Formel der freien Säure lautete:

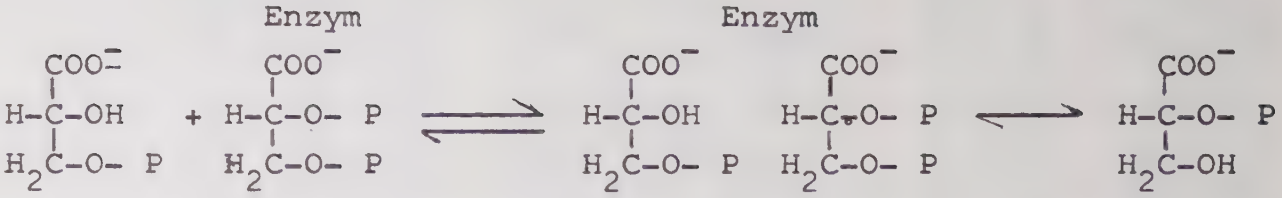


Er fand, daß der Stoff säurelöslich, relativ stabil und optisch linksdrehend ist.

b) Als einen Teilschritt der Glykolyse entdeckten MEYERHOF und KIESSLING (34), (35) 1935 im Muskelextrakt die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3-PG) zu 2-Phosphoglycerat (2-PG), eine intermolekulare Phosphatumlagerung über die Zwischenstufe 2,3-DPG. Das die Umwandlung katalysierende Enzym Phosphoglyceromutase (PGM) benötigt zur halbmaximalen Aktivität Konzentrationen von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) in der Größenordnung von 2,4 x 10^{-5} Mol/Liter, (54), (38), nach anderen Angaben (2) aber nur von 2,0 x 10^{-9} Mol/Liter. Es soll auch 2,3-DPG unabhängige PGM geben (45), (18).



Schema der Glycolyse



P = Phosphatrest

Intermolekulare Phosphatumlagerung von 2-PG zu 3-PG über 2,3 DPG (nach Karlson)

DPGM-= Diphosphoglyceromutase
2,3 DPG Pase = 2,3 Diphosphoglycerat-Phosphatase

R a p o p o r t - L u e b e r i n g - Z y k l u s

c) Bei weiteren Darstellungen fiel auf, daß 2,3-DPG in großer Menge in den Erythrozyten der meisten Säugetiere vorhanden ist, nicht oder nur in Spuren fand es sich in den kernhaltigen Erythrozyten der Vögel und Reptilien. (45), (56).

Phosphatverteilung im Erythrozyten des Menschen nach RAPOPORT:

ATP - Phosphat	13,5	mg/loo ccm Zellen
2,3-DPG-Phosphat	28	" /loo " "
anorganisches Phosphat	55	" /loo " "

Es ist demnach etwa doppelt so viel 2,3-DPG-Phosphat als ATP-Phosphat enthalten. GREENWALD und AYERS (18) und KUTAS und STÜTZEL (23) konnten interessante Beziehungen zwischen dem 2,3-DPG-Gehalt des Neugeborenen und dem des Erwachsenen feststellen. Hunde, Kaninchen, Schweine haben in der Neugeborenen-Phase weniger 2,3-DPG als später,bei den Wiederkäuern ist das Verhältnis umgekehrt, beim Menschen sind keine Altersunterschiede festzustellen.

Die bedeutenden Spezies-Unterschiede der Erwachsenentiere treten in den frühen Ontogenesephasen kaum hervor.
Als obligates Substrat der Glykolyse fand sich 2,3-DPG auch in Muskelgewebe und Hefe. Es ist überall vorhanden, wo Glukose anaerob abgebaut wird. Normalerweise ist der Gehalt des Gewebes mit Ausnahme des Erythrozyten an diesem Stoff gering. (49).

d) Synthetisiert wurde 2,3-DPG aus D-Glycerinsäuremethylester (1).
Aus Erythrozyten wurde es chromatographisch isoliert, seine Identität durch seine Wirkung auf die Phosphoglyceromutase-Reaktion (PGM-Reaktion) bewiesen (3), (4).

RAPOPORT (49), KRIMSKY (22) und GRISOLIA (19) synthetisierten 2,3-DPG sowohl im Muskelextrakt als auch im Hämolysat unter Zugabe von ATP und 3-PG.

e) Als Besonderheit verlieren die roten Blutzellen bei ihrer Reifung von den Erythroblasten zu den Erythrozyten strukturell den Kern, Mitochondrien und Mikrosomen, biochemisch die Fähigkeit zur Bildung von DNS, RNS (Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure), Proteinen, Lipiden und Hämoglobin; außerdem verlieren sie die Enzyme des Zitronensäurezyklus, des Glycerinsäure-1-Phosphatzyklus und der Atmungskette. Übrig bleiben nur die vollständigen Fermentketten der anaeroben Glykolyse und die Fermentketten des aeroben Glukoseabbaus über den Hexosemonophophatzyklus. Der 1. Weg wird zu 9o % benutzt, der 2. zu 1o %. In der Glykolyse wird unter Mitwirkung des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Systems ($NADH_2$-Systems) Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) gewonnen. Im Pentosephosphatzyklus werden mit Hilfe des Nikotinsäureamid-Adenin-Trinukleotidsystems ($NADPH_2$) Pentosephosphate für die Nukleotidsynthese gebildet und Gluthathion reduziert (26).
In diesem vereinfachten Stoffwechsel der roten Blutzelle fällt die verhältnismäßig hohe Konzentration von 2,3-DPG auf. Schon früh begannen Untersuchungen über die physiologische Bedeutung dieser Substanz.

So stellte BRAUNSTEIN (13) 1934 fest, daß 2,3-DPG im Hämolysat stabil ist, wenn ATP entfernt wird, hingegen schnell abgebaut wird in Anwesenheit von ATP (13).

Die Stabilität des 2,3-DPG im Vergleich zur Instabilität des 1,3-DPG fiel NEGELEIN 1939 (37) auf. In intakten Zellen schien beim pH des Blutes (ph = 7,34) ein Umsatz von 2,3-DPG stattzufinden, der mit der Aufrechterhaltung des ATP-Gehaltes gekoppelt sein könnte.

Ferner wurde die hohe Umsatzzahl der Substanz bemerkt, die der anderer Phophatester der roten Zelle vergleichbar ist (43).

Dieser Befund legte den Schluss nahe, daß 2,3-DPG in freiem Gleichgewicht mit einem obligatem Zwischenprodukt der Glykolyse steht (43).

RAPOPORT und LUEBERING faßten diese Vorbefunde so zusammen: "2,3-DPG steht im Gleichgewicht mit 1,3-DPG". Eine Diphosphoglyceromutase (DPGM) mußte angenommen werden, sie konnte später isoliert werden (44 , 47).

Eine Umkehrung der DPGM-Reaktion (von 2,3-DPG zu 1,3 DPG) muß angesichts der hohen Energiedifferenz der beiden Verbindungen als unwahrscheinlich gelten, denn bei der Umwandlung des Carboxylphosphats des 1,3-DPG in das Esterphosphat des 2,3-DPG werden ca. 7 Kalorien frei, da die Phosphatesterbindung nur 3 Kalorien beinhaltet (44 , 47).

Arbeiten mit gereinigter Mutase brachten daher auch keine Umkehr der Reaktion (47).

Ein Enzym, das 2,3-DPG zu 3-PG hydrolysiert wurde bereits 1949 beschrieben (53): die Diphosphoglyceratphosphatase (2,3-DPG-Phosphatase). Diese ist im Muskelextrakt sehr wirksam, daher ist der 2,3-DPG-Gehalt des Muskels niedrig. Hingegen ist die Aktivität der 2,3-DPG-Phosphatase im Erythrozyten sowie ihre Substrataffinität zu 2,3-DPG äußerst gering, eine messbare Hydrolyse findet erst bei sehr hohen 2,3-DPG-Spiegeln statt.

RAPOPORT und LUEBERING formulieren die Beziehungen des 2,3-DPG in folgendem Schema (46):

Dieser Zyklus besitzt autoregulativen Charakter.

2,3-DPG ist:

1.) Katalytischer Aktivator der PGM-Reaktion

2.) Substrat der 2,3-Diphosphoglyceratphosphatase (2,3-DPG-P-ase)

3.) Kompetitiver Hemmer der DPGM-Reaktion.

3-PG ist:

1.) Substrat der PGM-Reaktion

2.) Aktivator der DPGM-Reaktion

3.) Kompetitiver Hemmer der 2,3-DPG-P-ase-Reaktion.

Der Zyklus bringt einen Gesamtenergieabfall von 1o Kalorien, dabei wird kein ATP geliefert, der für die Glykolyse nötige ADP-Vorrat wird also geschont. Allerdings ist noch eine ATP-Bildung aus 2,3-DPG in der nachgeschalteten Pyruvatkinase-Reaktion (PK-Reaktion) möglich, während die erste ATP-bildende Phosphoglyceratkinase-Reaktion (PGK-Reaktion) irreversibel umgangen wurde.

Daß 2,3-DPG zugleich auch als Energiereservoir der Zelle dienen kann, bewiesen WHITMAN (6o) und PRANKERD (41), (42).

f) Aus der Stellung des 2,3-DPG im Stoffwechsel ist verständlich, daß es über den Energiehaushalt der Zelle indirekt am Kationen-Austausch beteiligt ist (38), (53), (5o).

DE VERDIER (16) schlägt auf Grund seiner Beobachtungen an konservierten Blutzellen vor, die 2,3-DPG-Konzentration als Gradmesser für die Erythrozyten-Überlebensfähigkeit zu benutzen, wobei sich allerdings gezeigt hat, daß im Acetat-Citrat-Dextose-Medium (ACD-Medium) die ATP-Konzentration verläßlichere Aussagen gestatten (39).

g) Neuere Untersuchungen von W. SCHRÖTER und Mitarbeiter (51, 62), zeigten, daß der Anteil des Glukoseabbaus über den 2,3-DPG-Zyklus nicht konstant ist, sondern von der intrazellulären ADP-Konzentration abhängt. Bei hohen intrazellulären ADP-Spiegeln wird der Abbau von 1,3-DPG zu 3 PG gefördert, bei niedrigen ADP-Angebot dagegen wird der Weg von 1,3-DPG zu 2,3-DPG bevorzugt.
Weiter konnten SCHRÖTER und WINTER (52) zeigen, daß die 2,3-DPG-Bildung auch in Abwesenheit von ADP durch Met-Hämoglobin zusätzlich stimuliert wird, und daß diese Stimulation durch Zusatz von ADP nur teilweise wieder aufgehoben werden kann. Dagegen wird die Reduktion des reversibel oxydierbaren Farbstoffes Dichlorphenol-indophenol durch das Coenzym $NADH_2$ bei 2,3-DPG-Zugabe verlangsamt.

BEUTLER (7, 8) LÖHR und WALLER (24, 25, 26, 27, 28, 29, 3o, 31, 32) VALENTIN und TANAKA (55) sowie PRANKERD (4o, 41) konnten in den letzten Jahren eine Reihe von genetischen Enzymdefekten im Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrozyten aufdecken und für die Pathogenese von nicht sphärozytären hämolytischen Anämien verantwortlich machen.

Klinische Befunde dieser Anämie (nichtsphärozytären hämolytischen Anämien) sind nach SELVYN und DACIE (15):

1. Keine Sphärozytose
2. Normozytäre bis makrozytäre Anämie
3. Normale osmotische Resistenz von Frischblut
4. Verminderte osmotische Resistenz nach 24-stündiger Inkubation
5. Erhöhung des indirekt reagierenden Bilirubins
6. Starke Erhöhung der spontanen Hämolyse, die nicht korrigierbar ist durch Zusatz von Inosin und Guanosin.

Man kann die nichtsphärozytären Anämien einteilen in die sogenannten

1. Innenkörper-Anämien
mit Defekten im Pentosephosphatzyklus (Glukose-D-Phosphatdehydrogenase, Glutathionreduktase, Glutathionsynthetase und 6-Phospho-Glukonat-Dehydrogenase) - bei denen eine Störung des Glutathiostoffwechsels zur - meistens drogeninduzierten - Hämolyse geführt hat - und

2. in die genetischen Enzymdefekte der Glykolyse, mit der Folge eines ATP-Mangels (Diphosphoglyceromutase- und Pyruvat-Kinase-Mangel), welche hier für den Zusammenbruch von Zellstoffwechsel und Struktur verantwortlich zu machen sind. (26)

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessiert besonders der 2,3-DPGM-Mangel. Bei Fällen dieses Typs der hämolytischen Anämie fand PRANKERD (42) nach glukosefreier Inkubation einen Abfall des 2,3-DPG-Gehalts. Glukose- und Inosin-Zustätze, die in normalen Blutzellen den 2,3-DPG-Spiegel wieder anheben, waren hier ohne Erfolg, hieraus schloß PRANKERD indirekt auf den Mangel an 2,3-DPGM. 1962 konnte LÖHR an 2 weiteren Patienten dieses Hämolysetyps ebenfalls indirekt einen Mangel an diesem Ferment nachweisen, die Basis seines Nachweises war die katalytische Wirkung des 2,3-DPG auf die PGM-Reaktion. Bei stark verlangsamter PGM-Reaktion fehlen ausreichende Mengen von 2,3-DPG und damit von DPGM.

Inzwischen gelang LÖHR (28) der direkte Nachweis eines Defektes der DPGM in den Erythrozyten von 3 weiteren Fällen, einen weiteren Fall eines Kindes mit angeborenem 2,3-DPG-Mangel konnte SCHRÖTER (51) berichten.

II Bisherige Ergebnisse der 2,3-DPG-Bestimmung

A) mit säulenchromatographischer Trennung und Nachweis nach BARLETT:

RAPOPORT (44) 1o4 x $1o^{-6}$ Mol/Liter

B) mit enzymkinetischer Methode

1. Messung des Verschwindens von Phosphoenolpyruvat bei 24o m/u
TOWNE (56) 9o x $1o^{-6}$ Mol/$1o^{11}$ Erythr.

2. Messung des Verschwindens von $DPNH_2$ bei 366 mμ
LÖHR und WALLER (26)
53 x $1o^{-6}$ Mol/$1o^{11}$ Erythr.
SCHROETER (36)
46 x $1o^{-6}$ Mol/$1o^{11}$ Erythr.

T A B E L L E

der Werte für die bisher bekannten Fälle mit 2,3-DPG-Mangel

Nr.	Pat.	Sex	DPGM	PGM	2,3 DPG	ATP	Laktatprod.
Normalwert	u=6o		33±6	13,1±2	64,4±13	16±2	38,4±3
1	B.T.	m	12	8,5	34,3	15,6	1o,7
2	V.M	w	-	4,6	1o,2	5,3	-
3	C.M	w	14	7,5	31,5	7,1	19,3
4	F.T.	w	17	6,1	24,5	5,8	13,o
5	Ch.Z	w	6	4,9	14,o	12,3	18,7
6	J.K	w	8	8,2	11,o	14,6	16,5

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch vergleichende, voneinander unabhängige Methoden zu prüfen, ob die von LÖHR und WALLER sowie von SCHROETER angewandte enzymkinetische Methode zur Bestimmung des 2,3-DPG verlässlich ist und mit den mittels Hochspannungs-elektrophorese erzielten Resultaten korrelierbare Werte liefert.

B) Methodik

1. Methode der elektrophoretischen Trennung und quantitativen Bestimmung (nach BARLETT) der 2,3-DPG.

1. Vorversuche:

a) Trennung:
2,3-DPG ist gut wasserlöslich, und wegen seiner hohen Fähigkeit H^+-Ionen abzudissoziieren, eine starke Säure. Es hat ein Molekulargewicht von 266. Bei einem pH von etwa 2,o liegt es als Anion vor, läuft also anodenwärts.
Wegen des relativ niedrigen Molekulargewichts werden hohe Spannungen zum Lauf des Stoffes benötigt, wie sie im Hochspannungselektrophorese gerät z.B. von Wieland & Pfleiderer erzeugt werden können.
Eine Spannung von 15oo V über 4o cm Länge des Trägers entspricht einem Spannungsabfall von 37,5 V/cm und erzeugt eine Stromstärke von 45 mA. Dieses Feld wurde je 4o Minuten angelegt, die Stromwärme wurde durch eine Kühlanlage abgeleitet.
Als Träger wurde Papier der Sorte "Schleicher & Schüll 2o4o b" (Mgl, phosphatfrei gewaschen) verwendet. Es zeichnet sich durch hohe Absorptionskraft aus (3,1 mVal/g Papier Austauschkapazität.

In ihrer Wanderungsgeschwindigkeit wurden verglichen:

2,3-Diphosphoglycerat als	Pentacylo-hex ammoniumsalz
3-Phosphoglycerat	Tricyclohexammo-niumsalz
2-Phosphoglycerat	Dinatrium
Phosphoenolpyruvat	Tricyclohexammo-niumsalz
Adenosin-Diphosphat	Dinatriumsalz
Adenosin-Tri-Phosphat	Trinatriumsalz
Fruktose-1,6-Diphosphat	Natriumsalz
Glukose-6-Phosphat	Natriumsalz

Davon wurden je 1 x 10^{-7} Mol pro Auftragsstelle auf den Träger gegeben.

Puffer:
CH_3COOH o,75 - Normal
C HCOOH 1 - Normal
} 1:1 gemischt pH 1,91

Es wurden Papierstreifen von 28 x 4o cm ausgeschnitten, der im Papier eingekerbte Pfeil zeigte in der elektrophoretischen Laufrichtung der Substanzen.
Die Auftragstellen für die Substanzen wurden 7 cm vom Schmalseitenrand mit Bleistift markiert, die Breite der Auftragsstelle betrug je 2,o cm, die des Zwischenraumes je 2,5 cm, die Entfernung der äußeren Auftragsstellen vom Rand je 1,7 cm.
Die Pufferschalen der Elektrophoresekammer

wurden randvoll mit obiger Pufferlösung beschickt, die zellophanumhüllten Elektrolytüberträger blieben zunächst eingetaucht. Die Puffer wurden nach je 2 Elektrophoresen gewechselt.

Es wurden 1 x 10^{-2} molare Lösungen der aufzutragenden Substanzen hergestellt; o,o1 ml davon enthielten 1 x 10^{-7} Mol, es wurden Mengen bis zu o,o3 ml wässriger Lösung pro Auftragsstelle aufgetragen, ab o,o4 ml begann die Substanz beidseits zu diffundieren und war daher nicht mehr exakt zu zentrieren.

Das Papier wurde vor dem Lauf in die Pufferlösung getaucht und, nachdem die überschüssige Flüssigkeit mit einer Walze herausgepresst war, auf die getrocknete Glasplatte gelegt und zur Vermeidung von Luftblasen angepresst.
Mit einer Mikropipette "Marburg" wurden den Probelösungen je o,o1 ml entnommen, (= 1 x 10^{-7} Mol) und die Pipettenspitze locker über die Auftragsstelle geführt, damit die Substanz gleichmässig vom Papier aufgenommen wurde.
Die leinernen Elektrolytüberträger wurden, der Pufferlösung entnommen, sorgsam vom Flüssigkeitsüberschuss befreit, und den Papierenden überlappend angelegt.
Elektrophoresepapier und zellophanumhüllte Elektrolytüberträger wurden mit einer Glasplatte bedeckt, die Kontakte hergestellt und die Spannung angelegt. Nach 4o-minütiger Laufzeit bei 15oo Volt und 45 mA = 67,5 Watt wurde das Pherogramm entnommen und bei

37°C in der Gebläsekammer getrocknet.

b) Nachweis der Zuckerphosphate nach BURROWS'

Der Nachweis der Zuckerphosphate nach BURROWS' (14) beruht auf der Darstellung des Phosphatanteils der Verbindung. Dazu muß der im Molekül gebundene Phosphor freigesetzt werden. Gebräuchlich ist die Hydrolyse mit starken Säuren.
Nach Hydrolyse wird das Phosphat sehr empfindlich durch die Phosphoammonium-molybdat-Reaktion erfaßt.

Phosphat + Ammoniumolybdat

Blaue Farbe (organisches Phosphat)

gelbe Farbe (anorg.Phosphat)

Verfahren

Reagens nach BURROWS'

1,o ml Ammoniummolybdat p. a.
8 ml Aqua bidest.
3 ml HCL 98 % p. a.
3 ml HCL O_4 7o % p. a.

Das Reagens wurde in dunkler Flasche aufbewahrt und als Tauchreagens verwandt.

Das in dieses Reagens eingetauchte Pherogramm trocknete am Glasständer, wurde nach dem Trocknen 1 Min. lang im Warmluftofen bei 8o Grad erwärmt und dann zur Farbentwicklung 1o bis 2o Min. mit UV-Licht bestrahlt.

In dieser Zeit entwickelten sich die organischen Phosphatverbindungen als mittelblaue bis tiefblaue Flecke auf hellblauem Untergrund.
Die Flecken wurden sofort mit Bleistift umfahren, da sich in kurzer Zeit auch das übrige Papier anfärbte.

Ergebnisse der Vorversuche: Laufstrecke

Die Laufstrecke wurde, in Anlehnung an chromatographische Verfahren, in R_f-Werten ausgedrückt.

$$R_f = \frac{\text{Wegstrecke Startpunkt bis Fleckmittelpunkt}}{\text{Wegstrecke Startpunkt bis Elektrolytfront}}$$

R_f-Werte:

2,3-Diphosphoglycerat	o,33
3-Phosphoglycerat	o,19
2-Phosphoglycerat	o,18
Phosphoenolpyruvat	o,24
Adenosin-Di-Phosphat	o,11
Fruktose-1,6-Di-Phosphat	o,29
Fruktose-1-Phosphat	o,23
Glukose-6-Phosphat	o,24
Di-Oxy-Aceton-Phosphat	o,2o

Ergebnisse:

Unter den genannten Bedingungen läuft 2,3-DPG am schnellsten.

Die in o,1o ml enteiweissten Überstandes vorhandene Menge 2,3-DPG beträgt etwa 1×10^{-7} Mol. Wir wählten daher bei der Enteiweissung und Konzentrierung der Blutproben eine Konzentration von etwa 1×10^{-7} Mol 2,3-DPG in o.1 ml Blut.

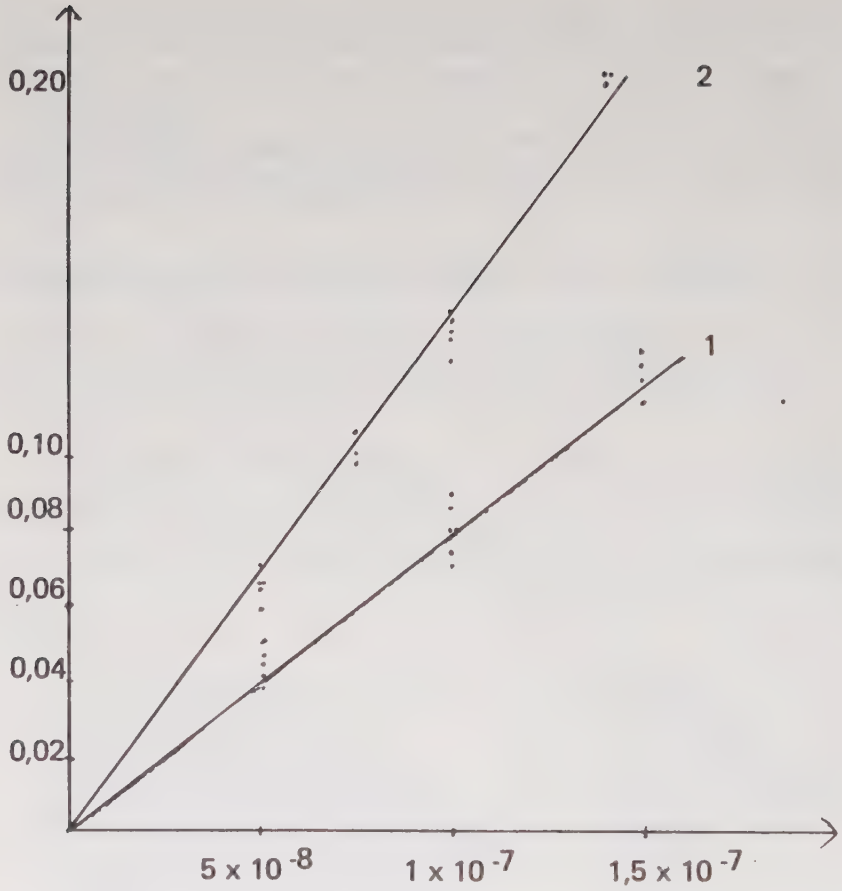
2. 3o Bestimmungen an Vollblutproben

Nach Trennung und bekannter Lokalisation der Reinsubstanz 2,3-DPG stellt sich die Aufgabe, den Stoffquantitativ zu erfassen. Die von BARLETT (5) angegebene Methode mit 4,5-Dihydroxy-2,7-naphtaler-Disulfonsäure (-Chromotropsäure) wurde leicht modifiziert.

Prinzip: Chromotropsäure geht mit Serin, Glycerin und Glycerophosphaten Verbindungen ein, die sich schwach gelb bis grünbraun anfärben. Je mehr Glycerophosphat vorhanden ist, desto intensiver wird die Farbe. Bei Filter 691 mμ und Photozelle 9o r wurde die Farbe im Photometer ("Eppendorf") registriert gegen glycerinfreie Leerwerte.

a) Reagentien für die Hautpversuche:

1. Eichlösung : 6 mg täglich frisch eingewogener 2,3-DPG wurde auf 10^{-5} Mol/ml Aqua bidest aufgefüllt.
(Molekulargewicht des Cyclohexammoniumsalzes der 2,3-DPG = 834)



Bestimmung der 2,3-DPG mit Chromotropsäure

Ordinate: Extinktion gegen Leerwert
Abszisse: Mol. Substrat/Test
1) ohne vorherige elektrophoretische Trennung
2) nach vorheriger elektrophoretischer Trennung

Die in o,1o ml enteiweissten Überstandes vorhandene Menge 2,3-DPG beträgt etwa 1×10^{-7} Mol. Wir wählten daher bei der Enteiweissung und Konzentrierung der Blutproben eine Konzentration von etwa 1×10^{-7} Mol 2,3-DPG in o.1 ml Blut.

2. 3o Bestimmungen an Vollblutproben

Nach Trennung und bekannter Lokalisation der Reinsubstanz 2,3-DPG stellt sich die Aufgabe, den Stoffquantitativ zu erfassen. Die von BARLETT (5) angegebene Methode mit 4,5-Dihydroxy-2,7-naphtaler-Disulfonsäure (-Chromotropsäure) wurde leicht modifiziert.

Prinzip: Chromotropsäure geht mit Serin, Glycerin und Glycerophosphaten Verbindungen ein, die sich schwach gelb bis grünbraun anfärben. Je mehr Glycerophosphat vorhanden ist, desto intensiver wird die Farbe. Bei Filter 691 mμ und Photozelle 9o r wurde die Farbe im Photometer ("Eppendorf") registriert gegen glycerinfreie Leerwerte.

a) Reagentien für die Hautpversuche:

1. Eichlösung : 6 mg täglich frisch eingewogener 2,3-DPG wurde auf 10^{-5} Mol/ml Aqua bidest aufgefüllt. (Molekulargewicht des Cyclohexammoniumsalzes der 2,3-DPG = 834)

2. Pufferlösung: o,75 - normale CH_3CCOH
1 - normale HCOOH

1 : 1 gemischt = pH 1,91

3. Tauchreagens: nach BURROWS' (siehe oben)

4. Chromotropsäurelösung (nach BARTLETT, modifiziert) (5).

o,1 g Chromotropsäure werden in 1oo ml 98 % H CL O_4 und unter leichtem Erwärmen und magnetischen Rühren völlig gelöst.

b) Extrakte aus enteiweisstem Vollblut.

Herstellen des Extraktes:

Frischblut und 6 % $HCLO_4$ im Verhältnis 1 : 2 wurden gut durchgemischt und 1o Minuten lang bei 5ooo g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Eisbad mit 2-normaler KOH bis pH = 7,o neutralisiert, dann nach 2o-min. Stehen im Eisbad zur Entfernung des restlichen $KCLO_4$ nachzentrifugiert. Vom Überstand wurden mit der 1oo-Mikroliter-"Marburg"-Pipette in je ein Plastikhütchen o,1 ml einpipettiert. Im Vakuum wurde das enteiweisste Vollblut ca. 2 Stunden lang getrocknet, dann wurde die Trockensubstanz im Eisbad in o,o2 ml Aqua bidest. gelöst. Zur völligen Befreiung von $KCLO_4$-Resten wurde nochmals nachzentrifugiert.

Das so entstandene 5-fache Konzentrat enthielt genügende Mengen an 2,3-DPG zum elektrophoretischen Nachweis.

c) Hochspannungselektrophorese:

Papiergrösse und -einteilung siehe oben.
Auftragstechnik: siehe oben.

Verteilung der aufzutragenden Substanzen

Pos. 1 bis 3: je 1 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG entsprechen o,o1 ml Lösung

Pos. 4 bis 6: je 1 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG entsprechen o,o1 ml Lösung

\+ Konzentrat aus o,1 ml Vollblut = o,o2 ml Lösung

Auf Pos. 4 bis 6 wurden daher je o,o3 ml Lösung aufgetragen.

Puffer: siehe oben
Laufdauer des Pherogramms: 45 Min.
Spannung: 15oo Volt
Stromstärke: 45 m Ampère

d) Lokalisation des 2,3-DPG

Die Seitenstreifen des getrockneten Pherogramms wurden 4,5 cm breit ausgeschnitten, auf ihnen wurde der Phosphatnachweis nach BURROWS' durchgeführt. Nach Erscheinen der blauen Flecken wurden die Streifen an das ungefärbte Mittelteil angelegt.

e) Aufsuchen der Lokalisation im ungefärbten Mittelteil:

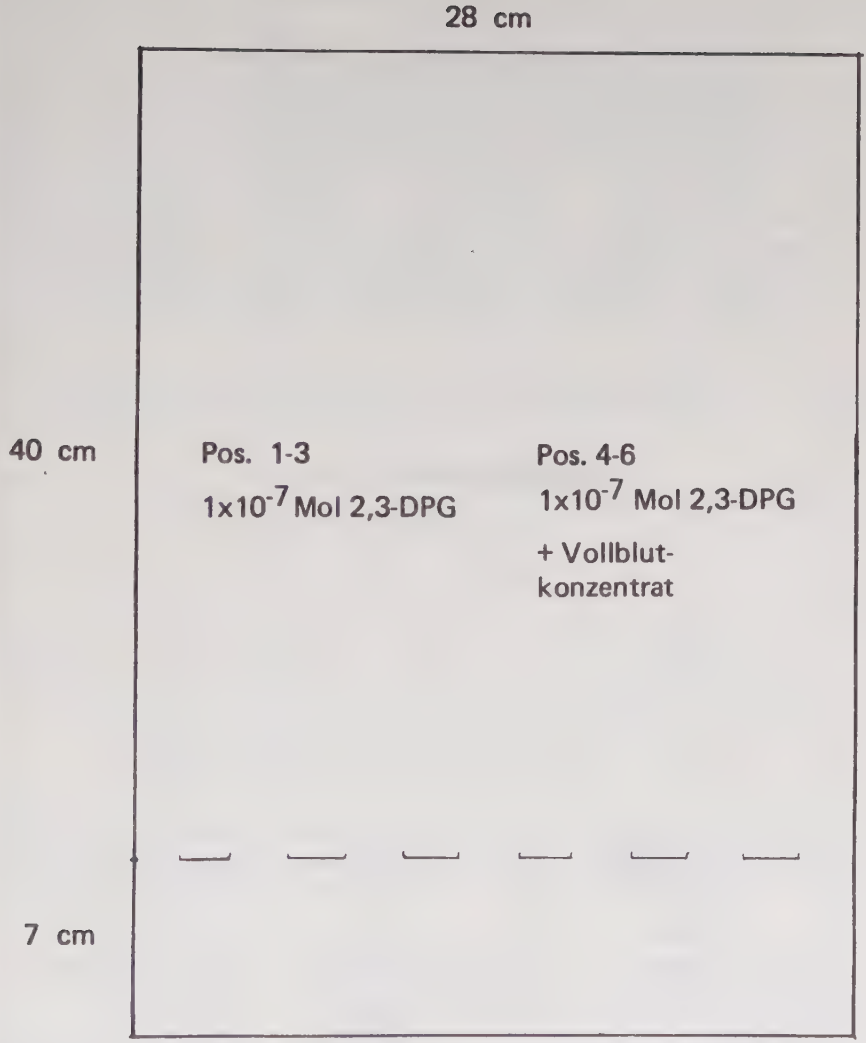
Die Schnittpunkte der angefärbten Leitfleckmittelpunkte mit der auf der Mitte der Startlinie errichteten Senkrechten sind die Mittelpunkte der gesuchten Flecken.

Voraussetzungen: Die Substanzen im Leitpherogramm (Randteil des Pherogramms) dürfen gegenüber der Startstelle nicht horizontal verschoben sein, sonst muss das Pherogramm verworfen werden.
Mit einem Plexiglasrahmen von 17 cm^2 Flächeninhalt wurden die Stellen,an denen die Substanz lokalisiert wurde, mit Bleistift umfahren und ausgeschnitten, gleichzeitig wurden unterhalb der Auftragsstellen für 2,3-DPG zwei Papierleerwerte ausgeschnitten.

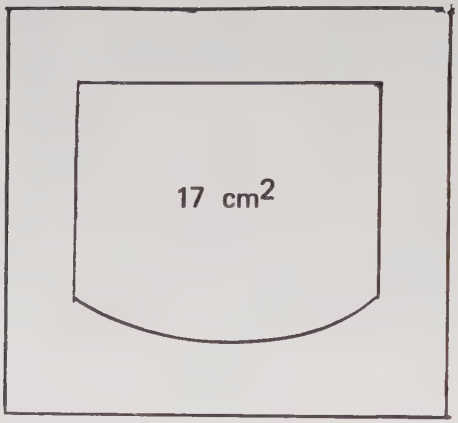
f) Elution und Trocknung:

Die Papierstücke wurden sofort nach dem Ausschneiden mit einer Pinzette auf ein vorbereitetes Deckglas schräg in einem Elutionsschälchen stehend, gelegt. Mit einem zweiten Deckglas wurde das Papier so eingeklemmt, dass es nach unten in die Kristallisationsschale hing. Als Elutionsmittel wurde Aqua bidest. randvoll in die Elutionsschalen gefüllt.
Die beiden Deckgläser bildeten nun einen kapillären Spalt, in dem das Wasser hochgesaugt und vom Papier aufgenommen wurde.
Die Kristallisationsschälchen wurden für 15o Min. in eine feuchte Kammer gebracht, während dieser Zeit füllten sie sich mit 2 bis 3 ml Eluat.
Das Papier wurde vollständig eluiert. Als Beweis wurde BURROWS' Phosphatanfärbung durchgeführt: es ließ sich kein Phosphat mehr nachweisen.

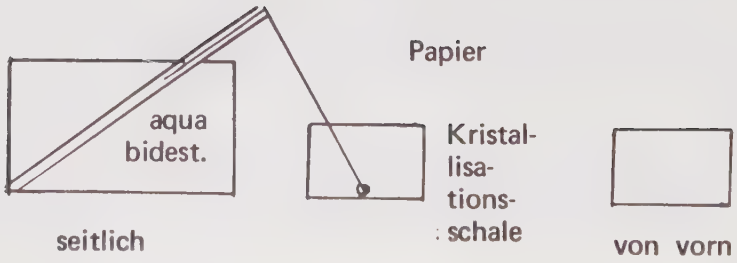
Das Eluat wurde 6 bis 8 Stunden im Gefriervakuum oder im kieselgelbeschickten Exsikkator getrocknet.



Elektrophoresepapier mit Anordnung der Auftragstellen und Auftragssubstanzen im Maßstab 1 : 3



Plexiglasrahmen



Elutionsverfahren

g) Kochbad

Die Trockensubstanz wurde fraktioniert in 3 ml frischbereiteter Chromotropsäurelösung gelöst und in Reagensgläser ausgespült, die dann 12o Min. lang ins kochende Wasserbad gestellt wurden.
Hierbei entwickelte sich die charakteristische Farbe, deren Intensität, in etwa dem LAMBERT-BEER'-schen Gesetz folgend, der 2,3-DPG-Konzentration direkt proportional ist.

LAMBERT-BEER'sches Gesetz:

1. $I : I_o$ = Durchlässigkeit

2. $- \log I : I_o$ = Extinktion

3. $- \log I : I_o = c \times d \times \epsilon$

wobei c die Konzentration des zu messenden Stoffes,
d die Schichtdicke der Probe
ϵ der Extinktionskoeffizient des zu messenden Stoffes ist.

Aus dem Wasserbad entnommen und kurz in kaltes Wasser gestellt, bleibt die Farbe der Probe beständig.

h) Messung und Berechnung:

Bei = 691 mμ, Photozelle = 9o r und Schichtdicke = 1,o cm wurde die Extinktion der Proben im Photometer "Eppendorf" gemessen.

Nach folgender Formel wurde der Gehalt an 2,3-DPG berechnet:

1.

$$\frac{\text{Ext.(Hauptw.-Leerw.)} \times \text{(Hauptw.-Leerw.)}}{\text{Ext./ } 10^{-7}\text{Mol NADH}_2} \times \text{V.F.} \times 0{,}1$$

(e. K.) - (2,3 DPG papier)

= Mol 2,3 DPG/ml Vollblut Konzentrat

2.

$$\frac{\text{Mol 2,3-DPG/ml Vollblutkonzentrat} \times 100}{\text{Erythrozytenzahl/ml} \times 10^{-6}}$$

= Mol 2,3 DPG/10^{11} Erythrozyten

Ein Beispiel der Berechnung:

Mole 2,3-DPG	Menge entw. Vollbl.	Extinkt. geg. Luft	zur Berechn. genomm. Wert	Wert leerw.
1) -	-	0,225	0,233	
2) -	-	0,240		
3) 1×10^{-7}	-	0,380	0,362	0,129
4) 1×10^{-7}	-	0,345		
5) 1×10^{-7}	100 mμ	0,500	0,478	0,245
6) 1×10^{-7}	100 mμ	0,455		

Hieraus in 100 μl gefundene Mole 2,3-DPG =

$$\begin{array}{r} 1{,}9 \times 10^{-7} \\ -\ 1{,}0 \times 10^{-7} \\ \hline 0{,}9 \times 10^{-7} \end{array}$$

Dieser Wert wurde in obige Formeln eingesetzt:

Dabei V.F. (Verdünnungs-Faktor) - 2,48

(1. V.F. = 2 (1 : 1 Blut: $HClO_4$)

(2. V.F. = 1,24 Neutralis.)

und Erythrozytenzahl/mm^3 = 3,o x 10^9/ml Blut

(1) $\frac{0,9 \times 10^{-7} \times 2,48}{0,1}$ = 2,23 x 10^{-6}Mol/ml Blut

(2) $\frac{2,23 \times 10^{-6} \times 100}{3,0}$ = 74,3 x 10^{-6}Mol 2,3 DPG 10^{11}Ery

1. Tabelle der 3o Werte in Mikromol/10^{11} Erythrozyten

Pat.Nr.	Mikromol 2,3-DPG/10^{11} Ery.	x^+-x	$(x^+-x)^2$
1	63,5	9o	81,o
2	62,o	1o,5	1o2,5
3	82,o	9,5	9o,2
4	8o,o	7,5	56,2
5	79,o	6,5	42,2
6	63,5	9,o	81,o
7	77,5	5,o	42,2
8	76,o	3,5	12,2
9	88,o	15,5	24o,o
1o	64,o	8,5	72,o
11	8o,o	7,5	46,o
12	86,o	13,5	182,2
13	74,o	1,5	2,2
14	78,o	5,5	3o,2
15	67,o	5,5	3o,2
16	83,o	1o,5	1o2,2
17	67,o	5,5	3o,2
18	87,o	3o,2	3o,2
19	69,o	3,5	12,2
2o	73,o	o,5	o,2
21	63,o	9,5	9o,2
22	61,o	11,o	121,2
23	53,5	19,o	361,2
24	82,5	9,5	9o,2
25	72,o	o,5	o,2
26	63,o	9,5	9o,5
27	7o,o	2,5	6,2
28	69,o	3,5	12,2
29	63,o	o,9	9o,2
3o	78,o	5,5	3o,2
	2175,5		216o,6

Mittelwert aus 3o Werten:

$2175{,}5 : 3o = \underline{\underline{72{,}5}}$

Fehlerrechnung

$$\sigma = \pm \frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \pm \frac{216o{,}6}{29} =$$

$$\pm 74{,}4 = \pm \underline{\underline{8{,}64}}$$

$$\sigma_m = \pm \frac{\sigma}{n} = \frac{8{,}6}{5{,}4} = \underline{\underline{\pm 1{,}6}}$$

II. METHODE der enzymatischen Bestimmung von 2,3-DPG im Erythrozyten nach LÖHR

1. Testbasis, Testschema, Testansatz

Optische Test nach WARBURG und CHRISTIAN beruhen auf der charakteristischen Extinktion des $NADH_2$ im Gegensatz zum NAD bei 334 mu.
Bei der Oxydation des $NADH_2$ zum NAD ändert sich die Extinktion daher stöchiometrisch.
Wie bei vielen reduzierenden Reaktionen, wird bei dem Schritt

$$\text{Pyruvat} + NADH_2 \xleftrightarrow{LDH} \text{Laktat} + NAD \quad NADH_2$$

umgesetzt, worauf ein Grossteil der Teste für Enzyme und Substrate der Glykolyse beruhen.
Die Geschwindigkeit der Reaktion ist bei gleichbleibender Enzymaktivität abhängig von der Konzentration der Substrate und Coenzyme, der H- Ionen- Konzentration, der Art des Puffers und der Reaktionstemperatur.

Prinzip des Testes:
Die Monophosphoglyceromutase-Reaktion (PGM) benötigt katalytische Mengen von 2,3-DPG, definierte Mengen von 2,3-DPG müssen also die$ Reaktion beschleunigen, was an der rascheren Abnehme der Extinktion des $NADH_2$ bei = 3,66 mμ erkennbar ist. UNBEKANNTE Mengen von 2,3-DPG im enteiweißten, neutralisierten Überstand des Frischblutes beschleunigen die Abnahme der Extinktion der PGM-Reaktion in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.

Aus der Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit darf auf den Gehalt des Überstandes an 2,3-DPG geschlossen werden, falls durch vorheriges Anfertigen von Eichkurven mit definierten Mengen 2,3-DPG die Beschleunigung der Reaktionskinetik bekannt ist.

Testansatz

TRAP pH 7,5	o,1 $_m$ Mol/Test	1,ooo ml/Test
$MgCl_2$	o,5 $_m$ Mol/Test	o,o2o ml/Test
KCl	1 $_m$ Mol/Test	o,o8o ml/Test
ADP	$5x10^{-7}$ Mol/Test	o,o4o ml/Test
$NADH_2$	$5x10^{-7}$ Mol/Test	o,o25 ml/Test
PGM, 1:2o in TRAP		o,olo ml/Test
Enolase	27 U/mg	o,olo ml/Test
PK	125 U/mg	o,olo ml/Test
LDH	36o U/mg	o,olo ml/Test
3 PG	$5x10^{-6}$ Mol/Test	o,o3o ml/Test

Die Enzymeinheiten sind in internationalen Einheiten (U) angegeben.

1 U = 1 x 10^{-6} Mol Substrat Umsatz pro Minute bei 25 Grad C.
ADP, 3-PG, $NADH_2$ wurden vor Gebrauch enzymatisch ausgetestet. Nachdem die mit den ersten 8 Substanzen gefüllte Küvette im Lichtweg steht, wird die Reaktion mit 3-PG gestartet.

Bei allen Versuchen herrscht Temperatur-Konstanz von 25°C durch Thermostat und pH-Konstanz durch Überschuß von TRA-Puffer und Lösung von 2,3-DPG in TRA-Puffer.

2. Vorversuche

Die Vorversuche dienten der Orientierung, in welchen Konzentrationen 2,3-DPG die PGM-Reaktion messbar aktiviert.

Ergebnis: 2,3-DPG aktiviert die PGM-Reaktion in Konzentrationen von 2 x 10^{-8} Mol bis 2 x 10^{-7} Mol nach den hier vorgenommenen Messungen. Die halbmaximale Aktivierung liegt nach diesen Messungen bei etwa 5 x 10^{-8} Mol bis 1 x 10^{-7} Mol.

3. 3o Bestimmungen an Vollblutproben

a) Puffer, Ionen, Testsubstrate und -enzyme wurden nacheinander in Glasküvetten von je 1,o cm Schichtdicke pipettiert, dann mit einem Glasstab vermischt und im Lichtweg gestartet. Die Reaktion wurde vom Schreibgerät am Photometer registriert; Substrate, Enzyme enteiweisster Überstand standen während der Versuche im Eisbad bei 4°C.

Die Kinetik der vom Schreibgerät registrierten PGM-Reaktion wurde der Berechnung zugrunde gelegt. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde als Extinktion/Minute genommen (Verlängerung der Tangente an die Kurve am Anfang bis zum Schnittpunkt mit der Zeiteinheitslinie)

$$U_{PGM} = \frac{\text{Volumen d. Testansatzes x Extinktion/min.}}{NADH_2 \text{ x Schichtdicke der Küvette}}$$

Variabel waren:
Volumen des Testansatzes
Konzentration des 2,3-DPG

Konstant waren:

Schichtdicke der Küvette	=	1 cm
ϵ $NADH_2$	=	$3 \times 3 \times 10^{-6}$
Tra-P-Konzentration		1,000 ml
K Cl	"	0,080 "
$Mg\ Cl_2$	"	0,020 "
ADP	"	0,040 "
$NADH_2$	"	0,025 "
PGM	"	0,010 "
Enolase	"	0,010 "
Pyruvat-Kinase	"	0,010 "
LDH	"	0,010 "
Temperatur		25 °C
pH		= 7,5

Da es sich um einen enzymatischen Test handelt, zeigen ansteigende Mengen an 2,3-DPG nicht eine lineare, sondern eine parabole Beschleunigung der Reaktion, wie es für alle katalytischen Reaktionen gilt.
Es besteht eine gute Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit im Bereich von 5×10^{-8} bis $2{,}0 \times 10^{-7}$ Mol 2,3-DPG/Testansatz.

b) Die in ein Koordinatensystem mit der
Abszisse : Mole 2,3-DPG und der
Ordinate : U PGM

eingetragenen Werte des enteiweissten Vollbluts lassen die im enteiweissten Vollblut enthaltenen Mole 2,3-DPG berechnen.

Hieraus wurde der 2,3-DPG Gehalt von 10^{11} Erythrozyten bestimmt, wozu folgende Daten benötigt wurden:

1. Erythrozytenzahl / mm^3
2. Verdünnungsfaktor des enteiweissten Überstandes, sich zusammensetzend aus

   Enteiweissungs-Faktor und Neutralisations-Faktor.
3. $3,3 \times 1o^{-6}$ = ϵ von $NADH_2$

Berechnung:

Gehalt an 2,3-DPG / $1o^{11}$ Erythrozyten =

$$\frac{\text{Gehalt 2,3-DPG} \times \text{Verdünnungs-faktor} \times 1oo}{\text{Probe (ml)} \times \text{Erythrozyten/mm}^3 \times 1o^{-6} \times \text{Volumen d.Proben}}$$

Berechnung für das angeführte Beispiel:

Erythrozyten: $6,86 \times 1o^6/mm^3$

Verdünnungsfaktor: 4,8

a) in o,o5 ml enteiweisstem Überstand sind:

$2,8 \times 1o^{-8}$ Mol 2,3-DPG

b) in $1o^{11}$ Erythrozyten sind:

$$\frac{2,8 \times 1o^{-8} \times 4,8 \times 1oo}{4,82 \times o,o5} = 56 \times 1o^{-6} \text{ Mol 2,3-DPG}$$

c) in o,1o ml enteiweissten Überstandes sind.
$6,o\ 1o^{-8}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Erythrozyten sind:

$$\frac{6,o \times 1o^{-8} \times 4,8 \times 1oo}{4,84 \times o,1o} = 6o \times 1o^{-6} \text{ Mol 2,3-DPG}$$

Auf diese Weise wurden 3o Normalpersonen getestet. Graphische Darstellung der Ergebnisse siehe Abbildungsteil.

Ein Beispiel zur vollständigen Berechnung der 2,3-DPG-Konzentration im enzymatischen Test:

a) Eichkurve mit definierten Mengen an 2,3-DPG:

1. ohne 2,3-DPG v = 1,3o λ = 366 mμ

Ext/min I o,32o
II o,27o Mittelwert o,295

$$C_{PGM} = \frac{1,3o \times o,295}{3,3 \times 1o^{-6} \times 1,o} = o,116 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit $2,5 \times 1o^{-8}$ Mol 2,3-DPG (v = 1,31)

Ext/min I o,7oo
II o,76o Mittelwert o,73o

$$U\ PGM = \frac{1,31 \times o,73o}{3,3 \times 1o^{-6} \times 1,o} = o,29o \text{ U PGM/Test}$$

3. mit $5 \times 1o^{-8}$ Mol 2,3-DPG (v = 1,31)

Ext/min I o,9oo
II o,91o Mittelwert o,9o5

$$U\ PGM = \frac{1,31 \times o,9o5}{3,3 \times 1o^{-6} \times 1,o} = o,368 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 1 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG (v = 1,31)

Ext/Min I 1,o6o

II 1,o2o Mittelwerte 1,o4o

$$U\ PGM = \frac{1{,}31 \times 1{,}o4o}{3{,}3 \times 10^{-6} \times 1{,}o} = o{,}415\ U\ PGM/Test$$

5. mit 2 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG (v = 1,31)

Ext/min I 1,1oo

II 1,12o Mittelwert 1,15o

$$U\ PGM = \frac{1{,}31 \times 1{,}15o}{3{,}3 \times 10^{-6} \times 1{,}o} = o{,}458\ U\ PGM/Test$$

---

b) Teste mit enteiweisstem, neutralisiertem Überstand vom Frischblut

1. mit o,o5 ml enteiw. Über. (v = 1,35)

Ext/min I o,7oo

II o,7oo Mittelwert o,7oo

$$U\ PGM = \frac{1{,}35 \times o{,}7oo}{3{,}3 \times 10^{-6} \times 1{,}o} = o{,}286\ U\ PGM/Test$$

2. mit o,1o ml enteiw. Über. (v = 1,4o)

Ext/min I o,96o

II o,88o Mittelwert o,92o

$$U\ PGM = \frac{1{,}4o \times o{,}92o}{3{,}3 \times 10^{-6} \times 1{,}o} = o{,}382\ U\ PGM/Test$$

Tabelle der Ergebnisse für o,o5 ml enteiweißten Überstandes

Nr.	Werte x	$\bar{x} \mp x$	$(\bar{x} \mp x)^2$
1	46,9	18,9	357,2
2	86,5	2o,7	428,5
3	65,o	o,8	o,6
4	68,o	2,2	4,8
5	61,o	4,8	23,o
6	93,o	27,2	739,8
7	74,o	8,2	67,2
8	71,o	5,2	27,o
9	77,4	11,6	134,5
1o	63,9	1,9	3,6
11	67,3	1,5	2,2
12	74,3	8,5	72,2
13	88,3	22,5	5o6,2
14	91,o	25,2	635,o
15	51,8	14,o	196,o
16	48,5	17,3	299,2
17	63,4	2,4	5,8
18	56,5	9,3	86,5
19	76,5	1o,7	114,5
2o	45,o	2o,8	432,6
21	74,9	9,1	82,8
22	73,8	8,o	64,o
23	52,3	13,5	182,2
24	4o,o	25,8	665,6
25	52,2	13,6	185,o
26	59,5	6,3	39,8
27	45,o	2o,8	432,6
28	58,5	7,3	53,3
29	58,1	7,7	59,3
3o	91,o	25,2	635,o
	1974,6		6536,o

Mittelwert: $x = 1974,6 : 3o = \underline{\underline{65,8}}$

Fehlerrechnung:

$$\sigma = \pm \frac{(\bar{x} \pm x)^2}{n - 1} = \pm \frac{6536,o}{29} = \pm 225,3 = \pm 15,o$$

$$\sigma_m = \pm \frac{\sigma}{n} = \frac{15,o}{5,49} = 2,7$$

Ergebnis: In $1o^{11}$ Erythrozyten sind im Mittel 65,8 ± 15,o Mole 2,3 DPG enthalten.

Tabelle der Werte für o,1o ml enteiweissten Überstands

Nr.	gef. Werte x	$\bar{x} \pm x$	$(\bar{x} \pm x)^2$
1	44,6	18,4	338,6
2	7o,1	7,1	5o,4
3	46,8	16,2	263,o
4	66,o	3,o	9,o
5	58,5	4,5	2o,2
6	63,o	o,o	o,o
7	63,o	o,o	o,o
8	51,o	12,o	144,o
9	74,5	11,5	132,2
1o	68,3	5,3	28,1
11	64,9	1,9	3,6
12	64,6	1,6	3,2
13	87,5	24,5	6oo,2
14	77,7	14,7	216,1
15	47,7	15,3	234,1
16	5o,o	13,o	169,o
17	68,o	5,o	25,o
18	6o,o	3,o	9,o
19	8o,8	17,8	316,8
2o	52,8	1o,2	1o4,5
21	47,3	15,7	246,5
22	74,8	11,8	139,2
23	7o,1	7,1	5o,4
24	58,o	5,o	25,o
25	59,5	3,5	12,2
26	63,4	o,4	o,2
27	53,7	9,3	86,5
28	64,8	1,8	3,2
29	53,7	9,3	86,5
3o	84,o	21,o	441,o
	1889,1		3757,7

Mittelwert: $\bar{x} = 1889,1 : 30 = \underline{63,0}$

Fehlerrechnung:

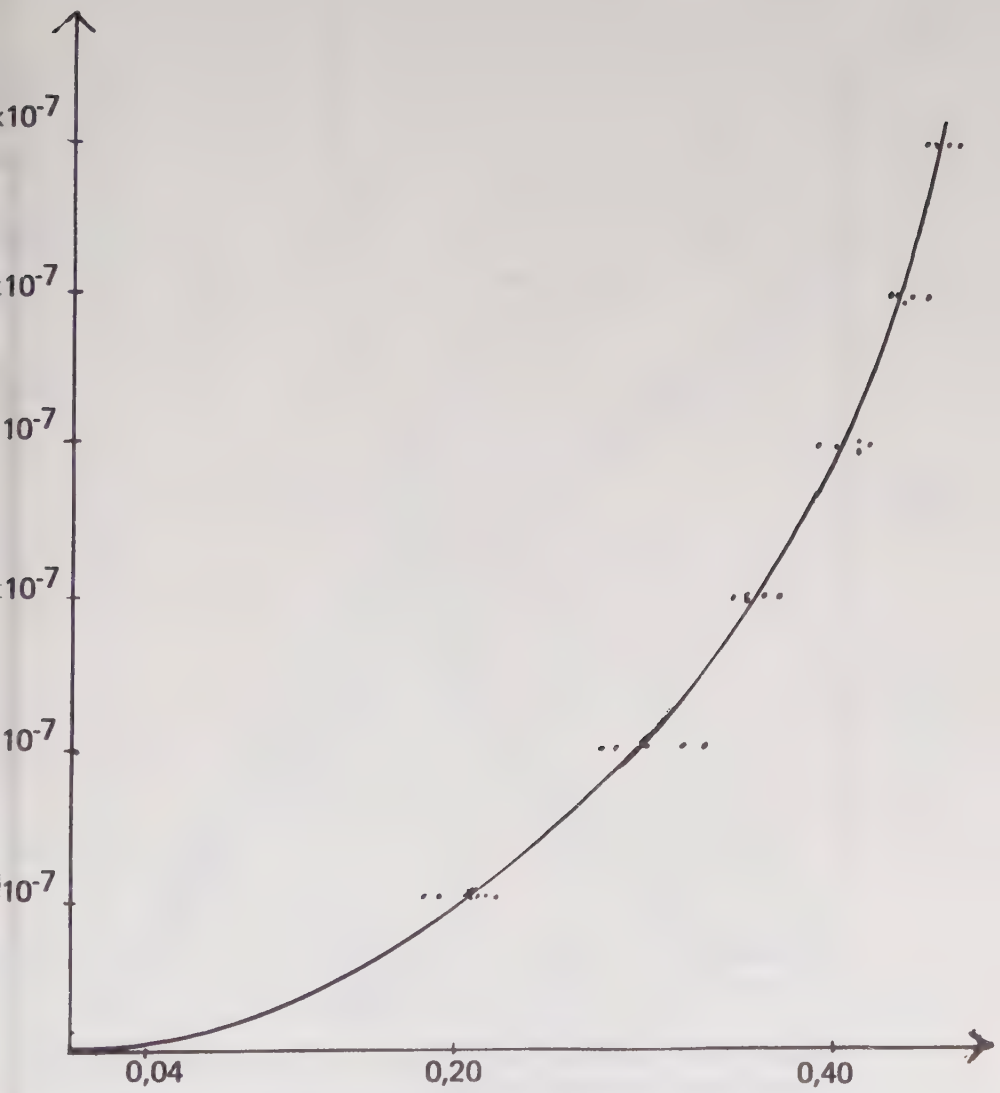
$$\sigma = \pm \frac{(\bar{x} \pm x)^2}{n - 1} = \pm \frac{3757,7}{29} = \pm 129,6$$

$$= \pm \underline{11,4}$$

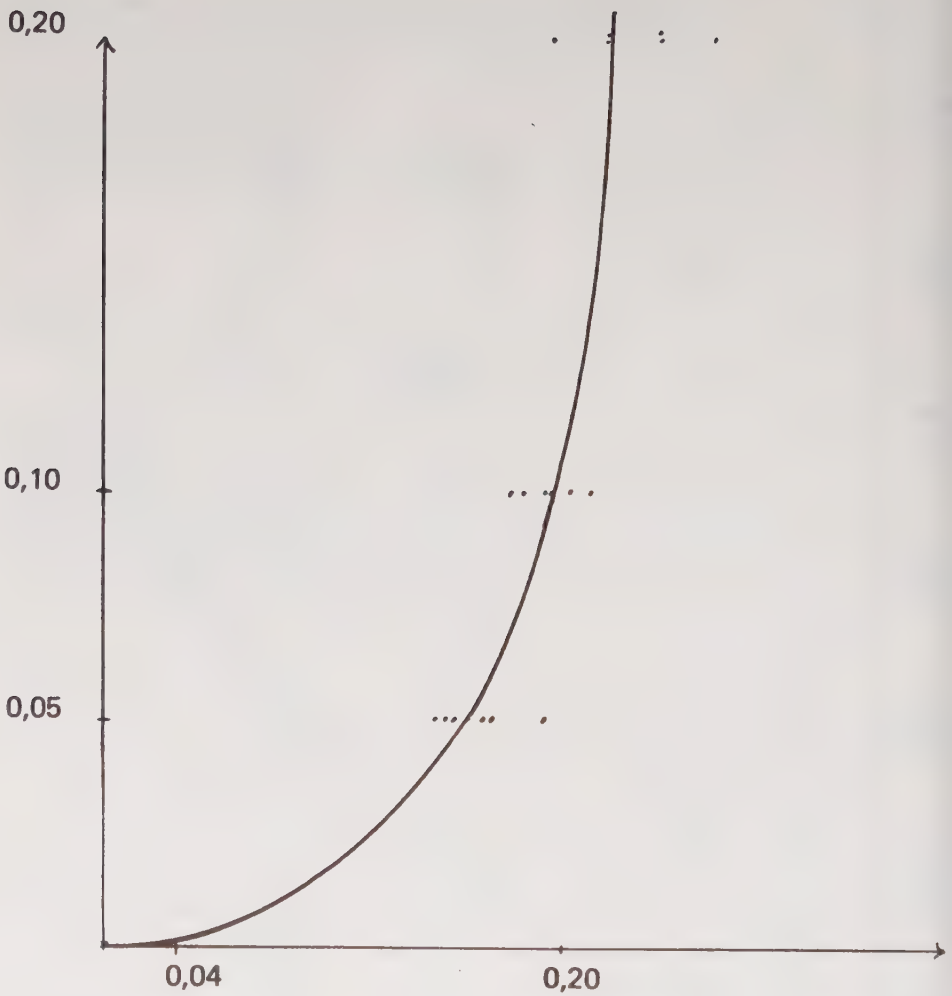
$$\sigma_m = \pm \frac{\sigma}{n} = \pm \frac{11,4}{5,49} = \underline{2,1}$$

Ergebnis:

In 10^{11} Erythrozyten sind hier 63,0 $\pm$ 11,4 Mol 2,3 DPG enthalten.

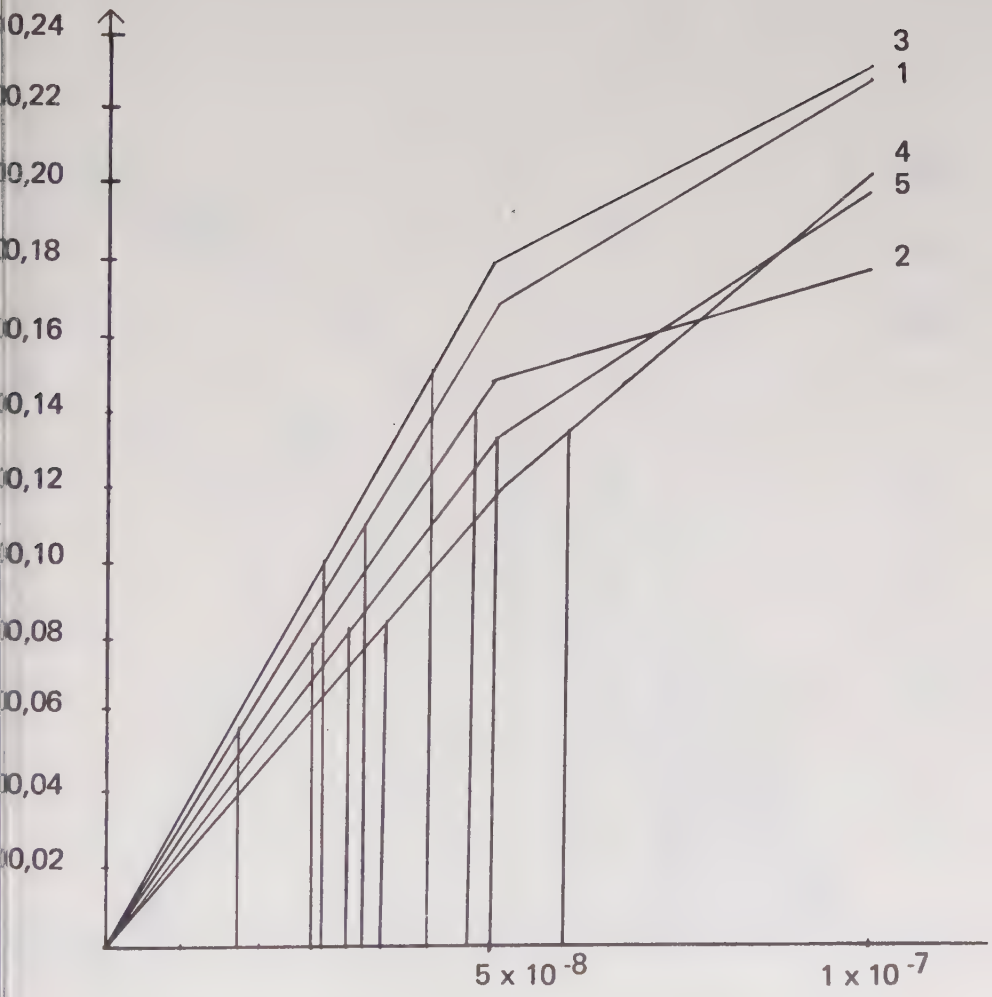


Abhängigkeit der PGM-Reaktion von definierten 2,3-DPG-Konzentrationen
Ordinate: eingesetzte Mol 2,3-DPG/Test
Abszisse: U PGM/Test

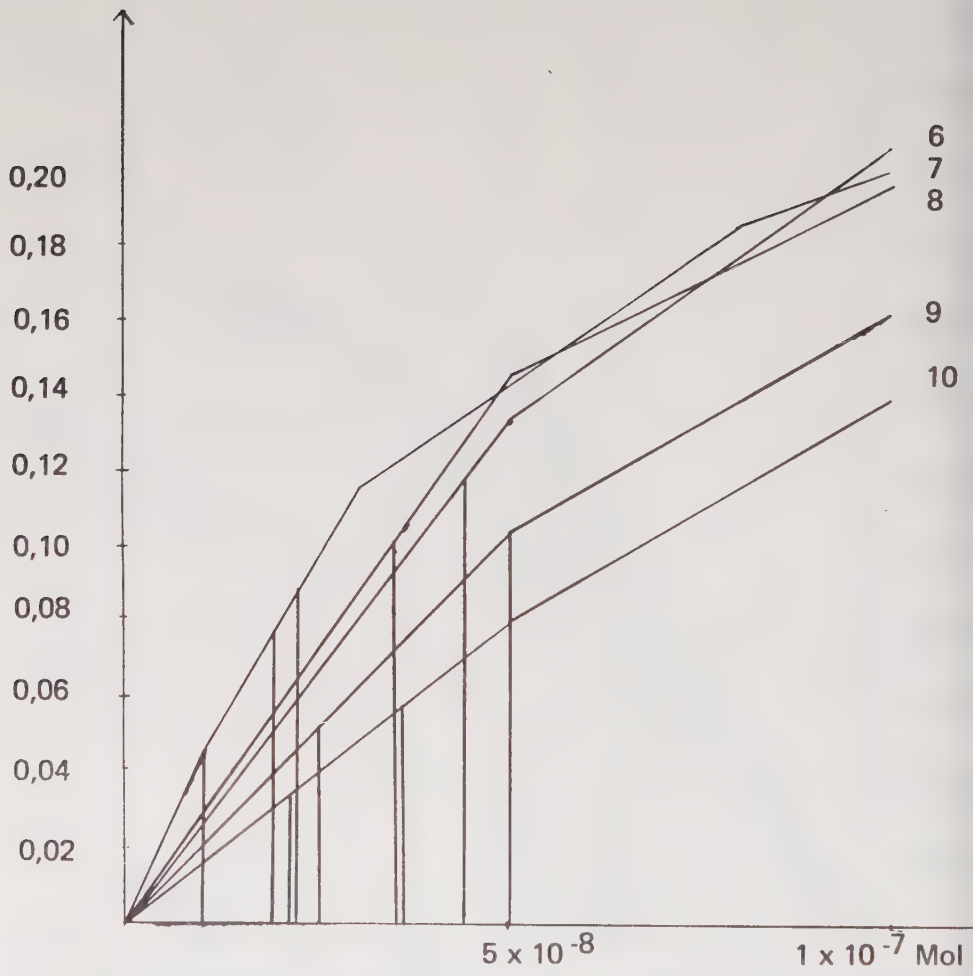


Abhängigkeit der PGM-Reaktion von 2,3-DPG-Konzentrationen in definierten Mengen Vollblut

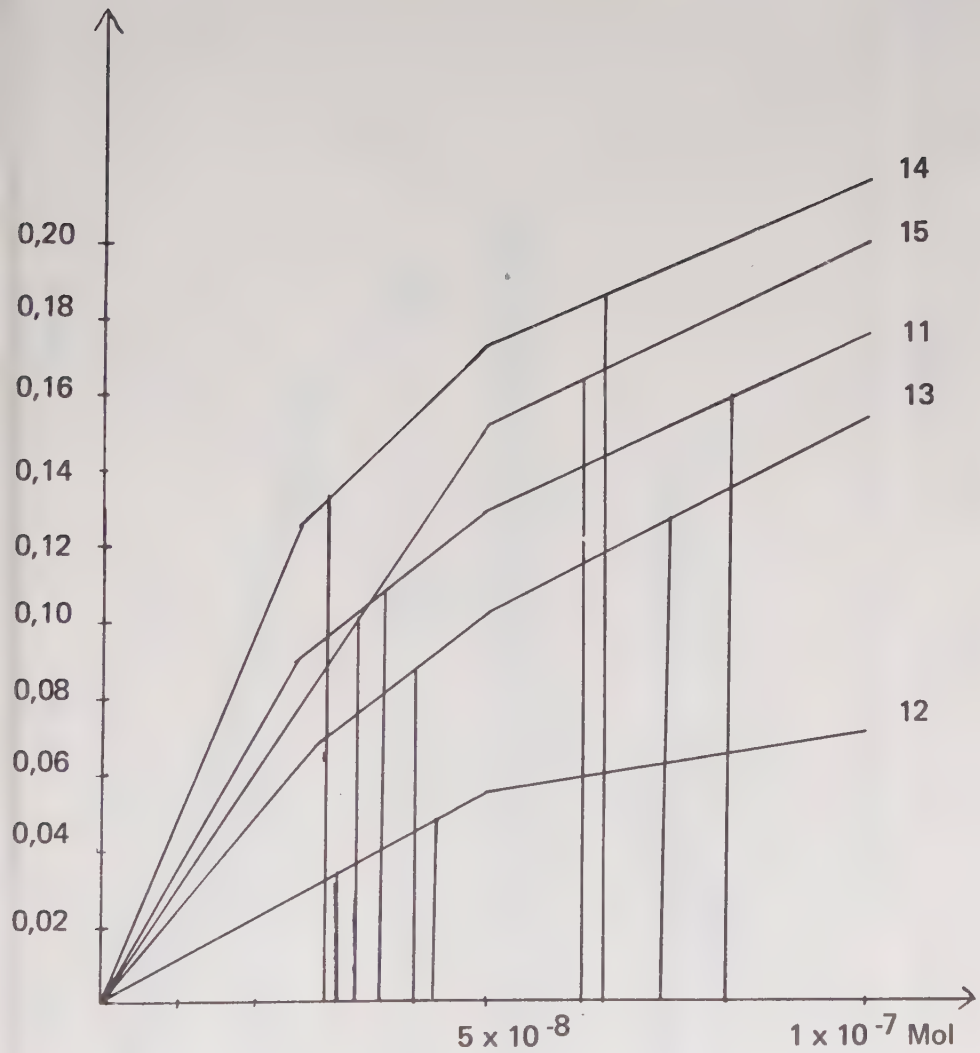
Ordinate: UPGM/Test
Abszisse: enteiweißtes Konzentrat aus Vollblut in ml/Test



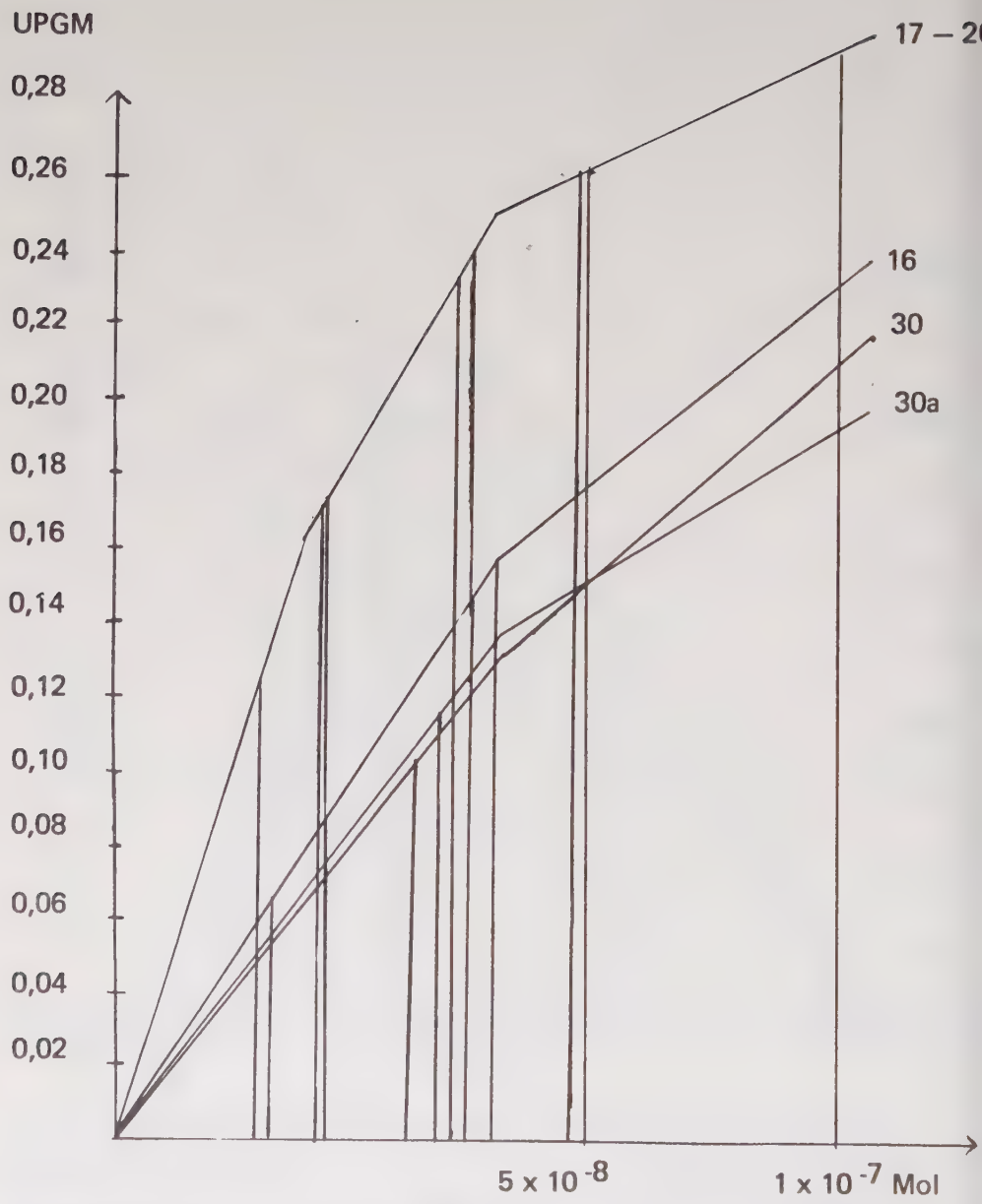
Kurven zum enzymkinetischen Test.
Werte 1-5 der Tabelle.
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: ermittelte Mol 2,3 DPG/Test



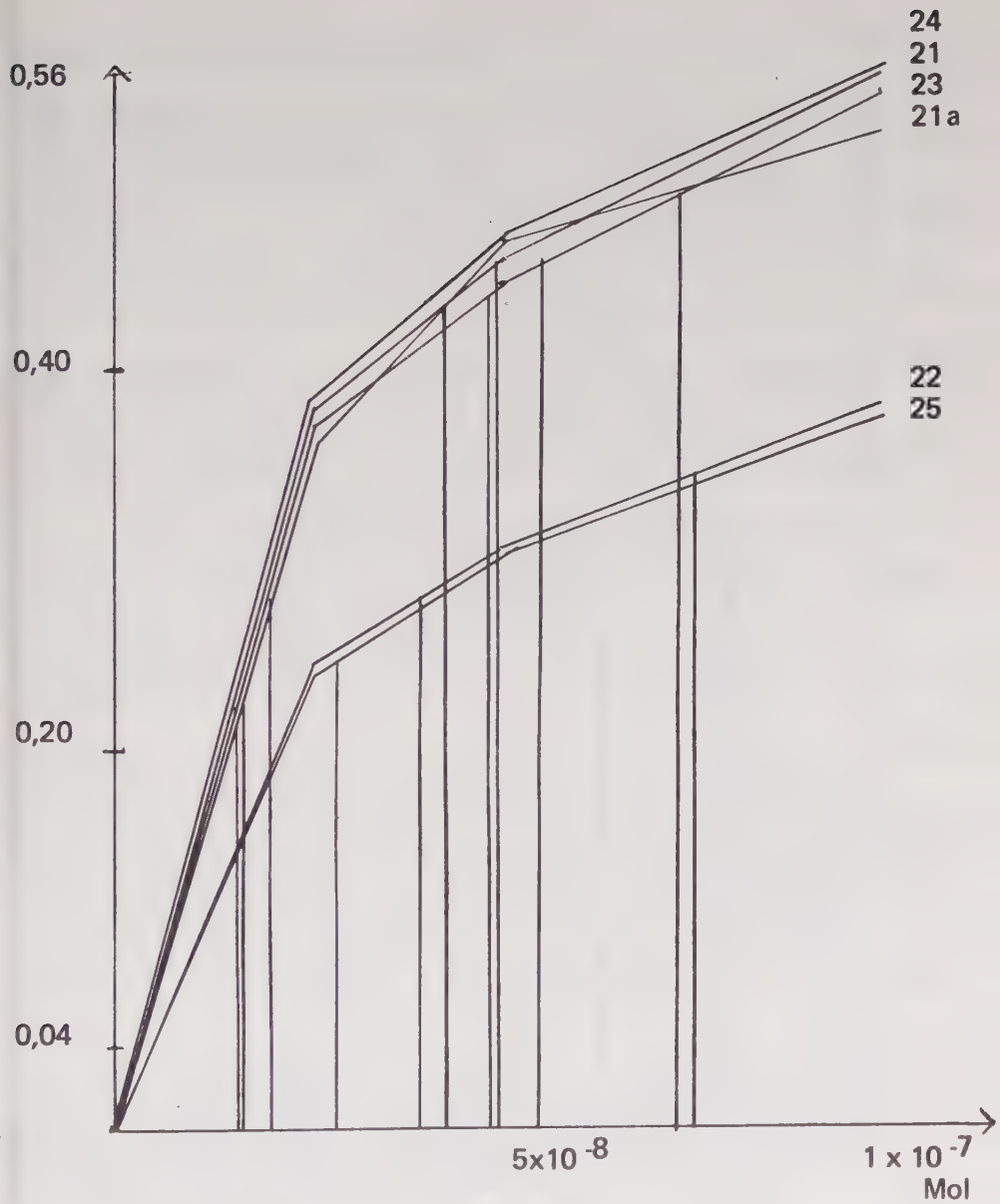
Kurven zum enzymkinetischen Test.
Werte 6 - 10 der Tabelle
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: ermittelte Mol 2,3-DPG/Test



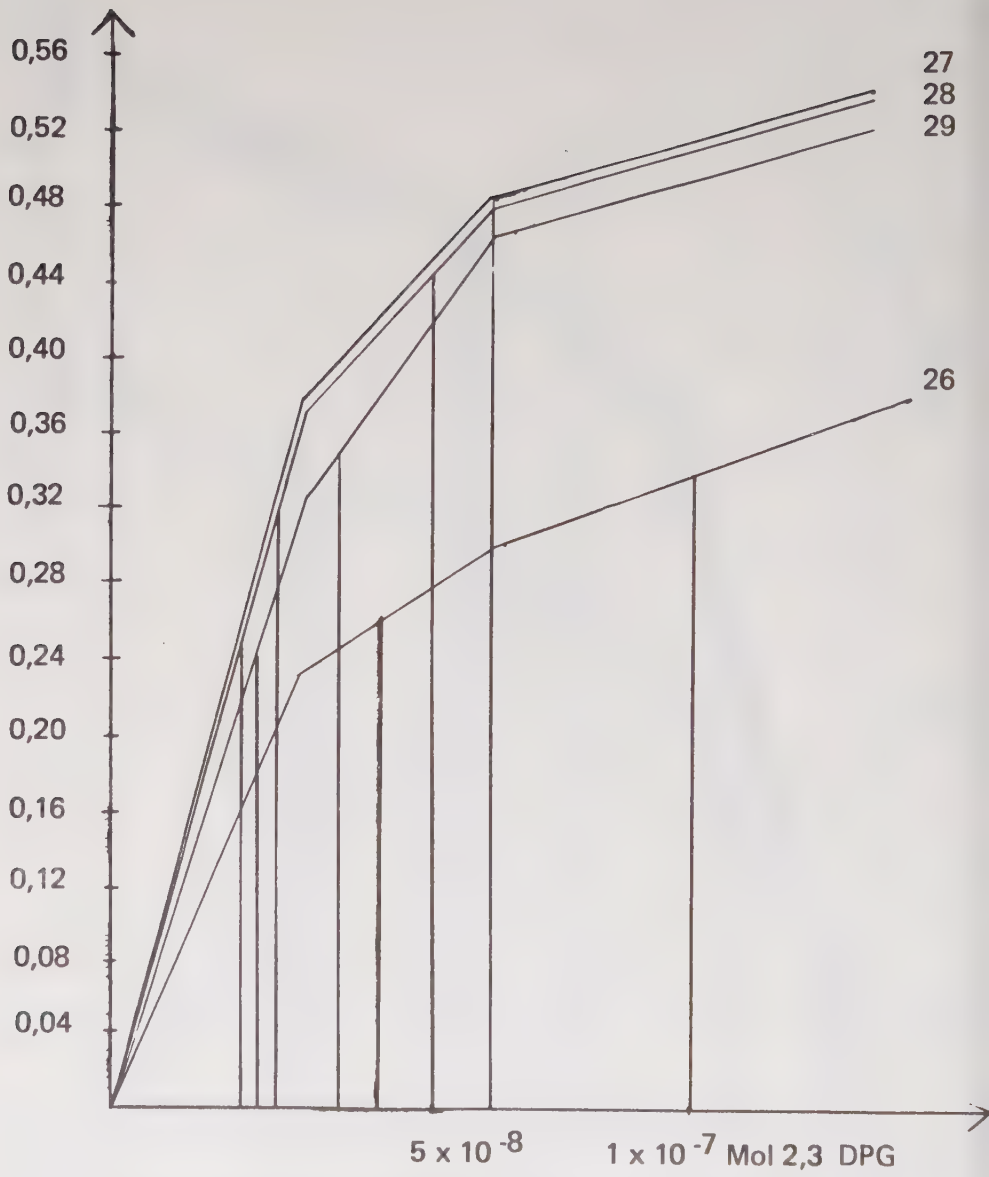
Kurven zum enzymkinetischen Test.
Werte 11-15 der Tabelle.
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: ermittelte Mol 2,3 DPG/Test



Kurven zum enzymkinetischen Test..
Werte 16-20 und 30 der Tabelle
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: ermittelte Mol 2,3-DPG/Tes



Kurven zum enzymkinetischen Test.
Werte 21-25 der Tabelle
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: ermittelte Mol 2,3-DPG/Test



Kurven zum enzymkinetischen Test.
Werte 26-29 der Tabelle.
Ordinate: U PGM/Test
Abszisse: Mol 2,3 DPG/Test

C. D I S K U S S I O N

Die Mittelwerte von je 3o Bestimmungen mit (1) der HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORETISCHEN Auftrennung der 2,3-DPG und der ENZYMKINETISCHEN Bestimmung nach LÖHR weichen deutlich voneinander ab, und zwar liegen die Mittelwerte der elektrophoretischen Methode um 11 % höher als die der enzymkinetischen.

Die Streuung vom Mittelwert ist bei Methode (1) zwar etwas geringer, diese höhere Genauigkeit wird jedoch beeinträchtigt durch größeren Aufwand an Material und Arbeitszeit.

Der Arbeitsaufwand für Methode (1) beträgt 2 Tage, verursacht durch die Markierung, Elution und Trocknung und Farbreaktion. Die enzymkinetische Methode ist in 2 Stunden zu bewältigen, gut reproduzierbar und kontrollierbar.

Die mit der hochspannungselektrophoretischen Methode gewonnenen Werte liegen wesentlich niedriger als die säulenchromatographisch erhaltenen von Rapoport und die enzymkinetischen durch Änderung des Phosphoenol-Pyruvats (PEP) - liegen aber höher als die von W. SCHROETER und Mitarbeitern mit einer ähnlichen enzymkinetischen Methode gewonnenen Werte.

Wir glauben, daß die enzymkinetisch gewonnenen Werte verlässlicher sind, weil die durchschnittlich 11 % höheren elektrophoretischen Werte durch einen systematischen Papierfehler vorgetäuscht werden können. Die Differenzen

in unserem enzymatischen Testsystem von 5 %, je nachdem, ob o,o5 oder o,1 ml enteiweisster Überstand im Test eingesetzt wurden, wird durch die größere Genauigkeit im Ablesen bei der niedrigeren Konzentration erklärt.

Man sollte daher die eingesetzte Menge enteiweissten Überstands in einer Grössenordnung halten, die weniger als 1 10^{-7} Mol 2,3-DPG/Testansatz enthält.

Die enzymatische Methode ist der elektrophoretischen zwar nicht an Genauigkeit, jedoch an Leichtigkeit der Methodik überlegen, und empfiehlt sich daher für die klinische Anwendung.

E R K L Ä R U N G

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Mai 1964 bis Oktober 1965 an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Dem Direktor, Prof. Dr. med. H.E. Bock, möchte ich danken für die großzügigen Arbeitsbedingungen an seiner Klinik.

Prof. Dr. med. G.W. Löhr, meinem Doktorvater danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung und Niederschrift der Arbeit. Außer der praktischen und theoretischen Anleitung durch ihn erhielt ich keine weitere Hilfe.

1. Zahlenteil zu Abb.:

Bestimmung der Glycerophosphate 2-PG und 2,3 DPG mit Chromotrophsäure nach Bartlett.

Mole Glycerophosphat	Ext.geg.Luft λ = 6 91 mμ	Ext.
Blindwert	o.o2o	
1 x $1o^{-7}$ M 2-PG	o,o42	o.o22
	o.o52	o.o32
2 x $1o^{-7}$ M 2-PG	o.o88	o.o68
	o.o65	o.o45
4 x $1o^{-7}$ M 2-PG	o.13o	o.11o
	o.148	1.128
1 x $1o^{-7}$ M 2,3DPG	o.o5o	o.o3o
	o.o45	o.o25
2 x $1o^{-7}$ M 2,3DPG	o.o82	o.o62
	o.o72	o.o52
4 x $1o^{-7}$ M 2,3DPG	o.138	o.118
	o.128	o.1o8

2. Zahlenteil zu Abb.:

Bestimmung des 2,3-DPG nach Bartlett ohne vorherige elektrophoretische Trennung.

Mole 2,3-DPG	Ext.geg.Luft	Leerwert	Ext.
o,5 x 10^{-7} Mol	o,1o8	o,o7o	o,o38
	o,12o	o,o8o	o,o4o
	o,125	o,o8o	o,o45
	o,115	o,o65	o,o4o
	o,115	o,o7o	o,o45
	o,12o	o,o7o	o,o5o
1,5 x 10^{-7} Mol	o,14o	o,o7o	o,o7o
	o,16o	o,o8o	o,o8o
	o,165	o,o8o	o,o85
1 x 10^{-7} Mol	o,148	o,o65	o,o73
	o,15o	o,o7o	o,o8o
	o,162	o,o7o	o,o92
1,5 x 10^{-7} Mol	o,175	o,o7o	o,115
	o,185	o,o8o	o,115
	o,218	o,o8o	o,138
	o,178	o,o65	o,113
	o,188	o,o7o	o,118
	o,195	o,o7o	o,125

3. Zahlenteil zu Abb.:

Bestimmung des 2,3-DPG nach Bartlett nach vorheriger elektrophoretischer Trennung.

Mole 2,3-DPG	Ext.geg.Luft 691 mμ	Leerwert	Ext.
o,5 x 10^{-7} Mol	o,55o	o,485	o,o65
	o,55o	o,485	o,o65
	o,55o	o,48o	o,o7o
	o,283	o,225	o,o58
	o,27o	o,225	o,o54
	o,34o	o,27o	o,o7o
o,75 x 10^{-7} Mol	o,59o	o,485	o,1o5
	o,585	o,485	o,1oo
	o,585	o,48o	o,1o5
1,o x 10^{-7} Mol	o,61o	o,485	o,125
	o,61o	o,485	o,125
	o,612	o,48o	o,132
	o,355	o,225	o,13o
	o,35o	o,225	o,125
	o,4o7	o,27o	o,137
1,5 x 10^{-7} Mol	o,425	o,225	o,2oo
	o,425	o,225	o,2oo
	o,47o	o,27o	o,2oo

Z A H L E N T E I L

zu PGM-Abhängigkeit von 2,3-DPG-Konzentrationen

I Ansatz siehe Text

V = veränderlich d = 1 cm λ = 366 µm

1. mit 1×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,25 ml)

   Ext/min 0,800

   $$C_{PGM} = \frac{0{,}800 \times 1{,}25}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}310 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit 2×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,26 ml)

   Ext/min 1,050

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}05 \times 1{,}26}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}400 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit 3×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,27 ml)

   Ext/min = 1,200

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}27 \times 1{,}20}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}465 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 4×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,28 ml)

   Ext/min = 1,400

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}28 \times 1{,}40}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}545 \text{ U PGM/Test}$$

5. mit $5x10^{-7}$ Mol 2,3 DPG (V = 1,29 ml)

Ext/min = 1,45o

$$C_{PGM} = \frac{1,29 \times 1,45o}{3,3x10^{6}x1,o} = o,568 \text{ U PGM/Test}$$

6. mit $6x10^{-7}$ Mol 2,3 DPG (V = 1,3o ml)

Ext/min = 15o

$$C_{PGM} = \frac{1,3o \times 1,5o}{3,3x10^{6}x1,o} = o,59o \text{ U PGM/Test}$$

7. ohne 2,3 DPG (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,3oo

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times o,3o}{3,3x10^{6}x1,o} = o,113 \text{ U PGM/Test}$$

II V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit $1x10^{-7}$ Mol 2,3 PDG (V = 1,25 ml)

Ext/min = 1,oo

$$C_{PGM} = \frac{1,25 \times 1,o}{3,3x10^{6}x1,o} = o,378 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit $2x10^{-7}$ Mol 2,3 DPG (V = 1,26 ml)

Ext/min 1,3o

$$C_{PGM} = \frac{1,26 \times 1,3o}{3,3x10^{6}x1,o} = o,495 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit 3×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,27 ml)

Ext/min = 0,330

$$C_{PGM} = \frac{1,27 \times 0,33}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,512 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 4×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,28 ml)

Ext/min = 1,460

$$C_{PGM} = \frac{1,28 \times 1,46}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,565 \text{ U PGM/Test}$$

5. mit 5×10^{-7} Mol 2,3DPG (V = 1,29 ml)

Ext/min = 0,540

$$C_{PGM} = \frac{1,20 \times 0,54}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,592 \text{ U PGM/Test}$$

6. mit 6×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,30 ml)

Ext/min = 0,600

$$C_{PGM} = \frac{1,30 \times 1,60}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,630 \text{ U PGM/Test}$$

7. ohne 2,3 DPG (V " 1,24 ml)

Ext/min = 0,420

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times 0,42}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,157 \text{ U PGM/Test}$$

III V = veränderlich d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit 1×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,25 ml)

Ext/min = 0,900

$$C_{PGM} = \frac{1,25 \times 0,90}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,340 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit 2×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,26 ml)

Ext/min = 1,200

$$C_{PGM} = \frac{1,26 \times 1,20}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,462 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit 3×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,27 ml)

Ext/min = 1,300

$$C_{PGM} = \frac{1,27 \times 1,30}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,502 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 4×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,28 ml)

Ext/min = 1,440

$$C_{PGM} = \frac{1,28 \times 1,44}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,558 \text{ U PGM/Test}$$

5. mit 5×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,29 ml)

Ext/min = 1,50

$$C_{PGM} = \frac{1,29 \times 1,50}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,587 \text{ U PGM/Test}$$

6. mit 6×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,30 ml)

Ext/min = 1,50

$$C_{PGM} = \frac{1,30 \times 1,50}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,590 \text{ U PGM/Test}$$

7. ohne 2,3 DPG (V = 1,24 ml)

Ext/min = om350

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times 0,35}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,132 \text{ U PGM/Test}$$

IV V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit 1×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,25 ml)

   Ext/min = 0,800

   $$C_{PGM} = \frac{1,25 \times 0,80}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,310 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit 2×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,26 ml)

   Ext/min = 1,00

   $$C_{PGM} = \frac{1,26 \times 1,00}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,382 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit 3×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,27 ml)

   Ext/min = 1,20

   $$C_{PGM} = \frac{1,27 \times 1,20}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,456 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 4×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,28 ml)

   Ext/min = 1,30

   $$C_{PGM} = \frac{1,28 \times 1,30}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,505 \text{ U PGM/Test}$$

5. mit 5×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,29 ml)

   Ext/min = 1,40

   $$C_{PGM} = \frac{1,29 \times 1,40}{3,3 \times 10^{6} \times 1,0} = 0,547 \text{ U PGM/Test}$$

6. mit 6×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,30 ml)

Ext/min = 1,450

$$C_{PGM} = \frac{1{,}30 \times 1{,}45}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}570 \text{ U PGM/Test}$$

7. ohne 2,3 DPG (V = 1,24 ml)

Ext/min = 0,290

$$C_{PGM} = \frac{1{,}24 \times 0{,}29}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}108 \text{ U PGM/Test}$$

V V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit 1×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,25 ml)

Ext/min = om840

$$C_{PGM} = \frac{1{,}25 \times 0{,}84}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}318 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit 2×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,26 ml)

Ext/min = 1,10

$$C_{PGM} = \frac{1{,}26 \times 1{,}10}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}420 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit 3×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,27 ml)

Ext/min = 1,220

$$C_{PGM} = \frac{1{,}27 \times 1{,}22}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}470 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit 4×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,28 ml)

Ext/min = 1,420

$$C_{PGM} = \frac{1{,}28 \times 1{,}42}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}550 \text{ U PGM/Test}$$

5. mit 5×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,29 ml)

Ext/min = 1,450

$$C_{PGM} = \frac{1{,}29 \times 1{,}45}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}468 \text{ U PGM/Test}$$

6. mit 6×10^{-7} Mol 2,3 DPG (V = 1,30 ml)

Ext/min = 1,500

$$C_{PGM} = \frac{1{,}30 \times 1{,}50}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}590 \text{ U PGM/Test}$$

7. ohne 2,3 DPG (V = 1,24 ml)

Ext/min = 0,320

$$C_{PGM} = \frac{1{,}24 \times 0{,}32}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}0} = 0{,}120 \text{ U PGM/Test}$$

B. Berechnungen zu den Eichkurven :PGM Abhängigkeit von 2,3-DPG-Konzentrationen im Vollblut

I V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit o,o5 ml enteiweißtem Konzentrat (V = 1,29 ml)

   Ext/min o,75o

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}29 \times o{,}75}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}o} = o{,}293 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit o,1o ml e.K. (V = 1,34 ml)

   Ext/min = o,82o

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}34 \times o{,}82}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}o} = o{,}33o \text{ U PGM/Test}$$

3. mit o,2o ml e.K. (V = 1,44 ml)

   Ext/min = 1,2oo

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}44 \times 1{,}2o}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}o} = o{,}522 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit o,3o ml e.K. (V = 1,54 ml)

   Ext/min = 1,35

   $$C_{PGM} = \frac{1{,}54 \times 1{,}35}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}o} = o{,}63o \text{ U PGM/Test}$$

5. ohne e.K., ohne 2,3 DPG (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,42o

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times o,42o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,157 \text{ U PGM/Test}$$

II V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit o,o5 ml e.K. (V = 1,29 ml)

Ext/min = o,76o

$$C_{PGM} = \frac{1,29 \times o,76}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,28o \text{ U PGM/Test}$$

2. mit o,1o ml e.K. (V = 1,34 ml)

Ext/min = o,8oo

$$C_{PGM} = \frac{1,34 \times o,8o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,325 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit o,2o ml e.K. (V = 1,44 ml)

Ext/min = 1,15o

$$C_{PGM} = \frac{1,44 \times 1,15}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,5o2 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit o,3o ml e.K. (V = 1,54 ml)

Ext/min = 1,3oo

$$C_{PGM} = \frac{1,54 \times 1,3}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,56o \text{ U PGM/Test}$$

5. ohne e.K. (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,35o

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times o,35}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,132 \text{ U PGM/Test}$$

III V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit o,o5 ml e.K. (V = 1,29 ml)

Ext/min = o,65o

$$C_{PGM} = \frac{1,29 \times o,65o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,254 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit o,1o ml e.K. (V = 1,34 ml)

Ext/min = o,75o

$$C_{PGM} = \frac{1,34 \times o,75}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,3o4 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit o,2o ml e.K. (V = 1,44 ml)

Ext/min = o,85o

$$C_{PGM} = \frac{1,44 \times o,85}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,34o \text{ UPGM/Test}$$

4. mit o,3o ml e.K. (V = 1,54 ml)

Ext/min = 1,2oo

$$C_{PGM} = \frac{1,54 \times 1,2o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,56o \text{ U PGM/Test}$$

5. ohne e.K. (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,29o

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times o,29}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,1o8 \text{ U PGM/Test}$$

IV V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mμ

1. mit o,o5 ml e.K. (V = 1,29 ml)

Ext/min = o,78o

$$C_{PGM} = \frac{1,29 \times o,78}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,31o \text{ U PGM/Test}$$

2. mit o,1o ml e.K. (V = 1,34 ml)

Ext/min = o,8oo

$$C_{PGM} = \frac{1,34 \times o,8o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,325 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit o,2o ml e.K. (V = 1,44 ml)

Ext/min = o,86o

$$C_{PGM} = \frac{1,44 \times o,8o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,345 \text{ U PGM/Test}$$

4. mit o,3o ml e.K. (V = 1,54 ml)

Ext/min = 1,28o

$$C_{PGM} = \frac{1,54 \times 1,28}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,6oo \text{ U PGM/Test}$$

5. ohne e.K. (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,3oo

$$C_{PGM} = \frac{1,24 \times o,3}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,113 \text{ U PGM/Test}$$

V V = veränderlich, d = 1 cm λ = 366 mµ

1. mit o,o5 ml e.K. (V = 1,29 ml)

Ext/min = o,6oo

$$C_{PGM} = \frac{1,34 \times o,8o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,325 \text{ U PGM/Test}$$

2. mit o,1o ml e.K. (V = 1,34 ml)

Ext/min = o,8oo

$$C_{PGM} = \frac{1,34 \times o,8o}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,325 \text{ U PGM/Test}$$

3. mit o,2o ml e.K. (V = 1,44 ml)

Ext/min = 1,o4o

$$C_{PGM} = \frac{1,44 \times 1,o4}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,455 \text{ UPGM/Test}$$

4. mit o,3o ml e.K. (V = 1,54 ml)

Ext/min = 1,3o

$$C_{PGM} = \frac{1,54 \times 1,3}{3,3 \times 10^{6} \times 1,o} = o,6o8 \text{ U PGM/Test}$$

5. ohne e.K. (V = 1,24 ml)

Ext/min = o,32o

$$C_{PGM} = \frac{1{,}24 \times o{,}32}{3{,}3 \times 10^{6} \times 1{,}o} = o{,}12o \text{ U PGM/Test}$$

Berechnungen zur Tabelle der Werte für den 2,3-DPG-Gehalt in 10^{11} Erythrozyten

Nr. 1) Ges.V.F. = 4,88 Ery 3,61 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,17 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,17 \times 10^{-7} \times 4,88 \times 100}{3,61 \times o,o5}$

= 46,9 x 10^{-6} Mol

b) in o,1o ml e.K. = o,33 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,33 \times 10^{-7} \text{ Mol} \times 100}{3,61 \times o,1o}$

= 44,6 x 10^{-6} Mol 2,3-PGM

Nr. 2) Ges.V.F. = 4,7o Ery 3,24 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,28 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,28 \times 10^{-7} \times 4,7o \times 100}{3,24 \times o,o5}$

= 86,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG/10^{11} E.

b) in o,1o ml e.K. = o,49 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,49 \times 10^{-7} \times 4,7 \times 100}{3,24 \times o,1}$

= 7o,1 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG/10^{11} E.

Nr. 3) Ges.V.F. = 4,83 Ery 4,o1 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,27 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,27 \times 1o^{-7} \times 4,83 \times 1oo}{4,o1 \times o,o5}$

= 65,o x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,43 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,43 \times 1o^{-7} \times 4,83 \times 1oo}{4,o1 \times o,1o}$

= 46,8 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 4) Ges.V.F. = 4,71 Ery 4,86 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,35 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,35 \times 1o^{-7} \times 4,71 \times 1oo}{4,86 \times o,o5}$

= 68 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,65 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,65 \times 1o^{-7} \times 4,71 \times 1oo}{4,86 \times o,1}$

= 66 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 5) Ges.V.F. = 4,87 Ery 4,16 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,26 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,26 \times 10^{-7} \times 4,87 \times 100}{4,16 \times o,o5}$

= 61 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,5o x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,5o \times 10^{-7} \times 4,87 \times 100}{4.16 \times o,1o}$

= 58,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 6) Ges.V.F. = 4,86 Ery 3,32 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,32 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,32 \times 10^{-7} \times 4,86 \times 100}{3,32 \times o,o5}$

= 93 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,43 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,43 \times 10^{-7} \times 4,86 \times 100}{3,32 \times o,1o}$

= 63 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 7) Ges.V.F. = 5,84 Ery 2,o5 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,13 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,13 \times 1o^{-7} \times 5,84 \times 1oo}{2,o5 \times o,o5}$

= 74 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,22 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,22 \times 1o^{-7} \times 5,84 \times 1oo}{2,o5 \times o,1o}$

= 63 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 8) Ges.V.F. = 4,5 Ery 5,27 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,42 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,42 \times 1o^{-7} \times 4,5 \times 1oo}{5,27 \times o,o5}$

= 71,4 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,62 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,62 \times 1o^{-7} \times 4,5 \times 1oo}{5,27 \times o,1o}$

= 51,o x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 9) Ges.V.F. = 4,5 Ery 3,o2 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,26 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,26 \times 1o^{-7} \times 4,5 \times 1oo}{3,o2 \times o,o5}$

= 77,4 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,5 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,5 \times 1o^{-7} \times 4,5 \times 1oo}{3,2 \times o,1o}$

= 74,5 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 1o) Ges.V.F. = 4,9 Ery 3,37 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,22 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,22 \times 1o^{-7} \times 4,9 \times 1oo}{3,37 \times o,o5}$

= 63,9 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,48 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,48 \times 1o^{-7} \times 4,9 \times 1oo}{3,37 \times o,1o}$

= 68,3 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

Nr. 11) Ges.V.F. = 3,9 Ery 4,75 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,41 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,41 \times 10^{-7} \times 3,9 \times 100}{4,75 \times o,o5}$

= 67,3 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,79 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,79 \times 10^{-7} \times 3,9 \times 100}{4,75 \times o,1o}$

= 64,9 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 12) Ges. V.F. = 4,9 Ery 3,27 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,27 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,27 \times 10^{-7} \times 4,9 \times 100}{3,27 \times o,o5}$

= 63 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,43 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} E_rY = $\frac{o,43 \times 10^{-7} \times 4,9 \times 100}{3,27 \times o,1o}$

= 64,4 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 13) Ges. V.F. = 3,99 Ery 3,48 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,42 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,42 \times 10^{-7} \times 3,99 \times 100}{3,48 \times o,o5}$

= 88,3 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,72 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,72 \times 10^{-7} \times 3,99 \times 100}{3,48 \times o,1o}$

= 87,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 14) Ges. V.F. = 4,33 Ery 3,5o Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,37 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,37 \times 10^{-7} \times 4,33 \times 100}{3,5o \times o,o5}$

= 91 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,63 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,63 \times 10^{-7} \times 4,33 \times 100}{3,5o \times o,1o}$

= 77,7 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 15) Ges. V.F. = 3,51 Ery 4,34 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,32 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,32 \times 10^{-7} \times 3,51 \times 100}{4,34 \times o,o5}$

= 51,8 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,59 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,59 \times 10^{-7} \times 3,51 \times 100}{4,34 \times o,1o}$

= 47,7 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 16) Ges. V.F. = 4,1 Ery 4,o1 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,21 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,21 \times 10^{-7} \times 4,1 \times 100}{4,o4 \times o,o5}$

= 48,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,46 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,46 \times 10^{-7} \times 4,1 \times 100}{4,o1 \times o,1o}$

= 5o,o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 17) Ges. V.F. = 5,1 Ery 4,5o Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,28 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,28 \times 10^{-7} \times 5,1 \times 100}{4,5 \times o,o5}$

= 63,4 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) o,1o ml e.K. = o,6o x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,6o \times 10^{-7} \times 5,1 \times 100}{4,5 \times o,1o}$

= 68,o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 18) Ges. V.F. = 4,8 Ery 4,82 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,28 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,28 \times 10^{-7} \times 4,8 \times 100}{4,82 \times o,o5}$

= 56,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,6o x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,6o \times 10^{-7} \times 4,8 \times 100}{4,82 \times o,1o}$

= 6o,o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 19) Ges. V.F. = 4,53 Ery 5,27 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,45 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,45 \times 10^{-7} \times 4,53 \times 100}{5,27 \times o,o5}$

= 76,6 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,94 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,94 \times 10^{-7} \times 4,53 \times 100}{5,27 \times o,1o}$

= 8o,8 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 2o) Ges. V.F. = 4,8 Ery 4,27 Mill/cm^3

in o,o5 ml e.K. = o,2 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,2 \times 10^{-7} \times 4,8 \times 100}{4,27 \times o,o5}$

= 45,o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. o,47 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,47 \times 10^{-7} \times 4,8 \times 100}{4,27 \times o,1o}$

= 52,8 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 21) Ges. V.F. = 2,88 Ery 4,5 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,58 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,58 \times 10^{-7} \times 2,88 \times 100}{4,5 \times o,o5}$

= 74,9 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) Ges. V.F. = 4,51 Ery 4,52 Mill/cm^3

in o,1o ml e.K. = o,49 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,49 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{5,o \times o,1}$

= 47,3 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 22) Ges. V.F. = 4,51 Ery 4,52 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,37 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,37 \times 10^{-7} \times 4,51 \times 100}{4,52 \times o,o5}$

= 73,8 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,75 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,75 \times 10^{-7} \times 4,51 \times 100}{4,52 \times o,1o}$

= 74,4 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 23) Ges. V.F. = 2,84 Ery 1,62 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,16 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,16 \times 10^{-7} \times 2,84 \times 100}{1,62 \times o,o5}$

= 52,2 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,42 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,42 \times 10^{-7} \times 2,84 \times 100}{1,62 \times o,1o}$

= 7o,1 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 24) Ges. V.F. = 4,71 Ery 4,12 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,2 x 10^{-7} Mol 2,3 DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,2 \times 10^{-7} \times 4,71 \times 100}{4,12 \times o,o5}$

= 4o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,51 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,51 \times 10^{-7} \times 4,71 \times 100}{4,12 \times o,1}$

= 58,1 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 25) Ges. V.F. = 4,83 Ery 5,4 Mill/cm^3

a) in o.o5 ml e.K. = o,28 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,28 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{5,40 \times o,o5}$

= 52,2 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,66 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,66 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{5,40 \times o,1}$

= 59,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 26) Ges. V.F. = 4,83 Ery 5,48 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,31 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,31 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{5,48 \times o,o5}$

= 59,9 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,74 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,74 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{5,48 \times o,1o}$

= 63,4 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 27) Ges. V.F. = 4,83 Ery 4,5 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,2 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,2 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{4,50 \times o,o5}$

= 45,o x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,5 x 10^{-7} 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,5 \times 10^{-7} \times 4,83 \times 100}{4,50 \times o,1o}$

= 53,7 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 28) Ges. V.F. = 5,3 Ery 4,5 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,24 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,24 \times 10^{-7} \times 5,3 \times 100}{4,50 \times o,o5}$

= 56,5 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

b) in o,1o ml e.K. = o,55 x 10^{-7} Mol 2,3-DPG

in 10^{11} Ery = $\frac{o,55 \times 10^{-7} \times 5,3 \times 100}{4,50 \times o,1o}$

= 64,8 x 10^{-6} Mol 2,3-DPG

Nr. 29) Ges. V.F. = 5,2o Ery 3,4 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,1o x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,19 \times 1o^{-7} \times 5,2o \times 1oo}{3,4o \times o,o5}$

= 58,1 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

==========

b) in o,1o ml e.K. = o,35 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,35 \times 1o^{-7} \times 5,2o \times 1oo}{3,4o \times o,1o}$

= 53,7 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

==========

Nr. 3o) Ges. V.F. = 4,84 Ery 1,69 Mill/cm^3

a) in o,o5 ml e.K. = o,16 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in o,1o ml e.K. = $\frac{o,16 \times 1o^{-7} \times 4,84 \times 1oo}{1,6o \times o,o5}$

= 91 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

==========

b) Ges. V.F. = 4,86 Ery 3,25 Mill/cm^3

in o,1o ml e.K. = o,65 x $1o^{-7}$ Mol 2,3-DPG

in $1o^{11}$ Ery = $\frac{o,65 \times 1o^{-7} \times 4,86 \times 1oo}{3,25 \times o,1o}$

= 84 x $1o^{-6}$ Mol 2,3-DPG

==========

Literaturverzeichnis

1 Baer, E.: "A Syntesis of 2,3-Diphospho-D-glyceric Acid" J Biol. Chem. 185, S. 763 (195o)

2 Bartlett, G.R.: "Colorimetric Assay Methods for free and Phosphorylated Glyceric Acids" J.Biol.Chem. 234, S. 469 (1958)

3 Bartlett, G.R.: "Human red Cell Glycolytic Intermediates" J. Biol. Chem. 234, S. 449 (1959)

4 Bartlett, G.R.: "Methods of Isolation of Glycolytic Intermediates by Colunm Chromatography with Ion Exchange Resins" J. Biol. Chem. 234, S, 459 (1959)

5 Bergmeyer, H.U.: "Methoden der enzymatischen Analyse" Weinheim, Verlag Chemie 1962

6 Beutler, E.: "The Hemolytic Effect of Primaquine and Relates Compounds: a Review" Blood 147, S. 1o3 (1959)

7 Beutler, E.: "Drug-induced Hämolytic Anämias and the mechanism and Significance of Heinz Body Formation in Red Blood Cells" Nature (Lond.) 196, S. 1o5 (1962).

8 Biochemica Boehringer: "Enol"-Enolase, Information, Mannheim 1961
"PK"-Pyruvatkinase, Information, Mannheim 1961
"LDH"-Laktatdehydrogenase, Information, Mannheim 1965

9 Biochemica Boehringer: "PGM"-3-Phosphoglyceratmutase, Information, Mannheim 1961

10 Biochemica Boehringer: "2,3-PgP", D(-)-2,3-Diphosphoglycerat", Information, Mannheim 1966

11 Bowdler, A.J. and T.A.J. Prankerd: "Studies in Congenital Nonspherocytic Hämolytic Anämias with Specific Encyme Defect", Acta Hämatol. 31, S. 65, (1964)

12 Braunstein, A.E.: "Über Phosphoglycerate in roten Blutkörperchen", Biochem. Z. 272, S. 21 (1934)

13 Burrows, S., F.S.M. Grylis and J.S. Harison: "Paper Chromatography of Phosphoric Esters", Nature (Lond) 17o, S. 8oo (1952)

14 Dacie, I.V., V. Matison and L. Shapiro: "Atypical Congenital Hämolytic Anämia Quart. J. Med. 22, S. 79 (1953)

15 De Verdier, C.F. and A. Kiellander: "Storage of Human Red Cells" Acta Physiol. Scand. 6o, S. 114 (1964)

16 Greenwald, J.: "A New Type of Phosphoric Acid Compounds Isolated from Blood, with some Remarks on the Effect of Substitution on the Rotation of l-glyceric Acid" in J. Biol. Chem. 63, S. 339 (1925)

17 Greenwald, J. and V.E. Ayers: "2,3-Diphosphoglycerate and Other Intraerytrocytar Acid-soluble Phosphates in Joung Rabbits", J. Cell Comp. Physiol. 53, S. 3o7 (1959)

18 Grisolia, S. and B.K. Joyce: "Enzymatic Systhesis and Isolation of 2,3-Diphosphoglycerate", J. Biol. Chem. 233, S. 18 (1958)

19 Grisolia, S. und B,K. Joyce: "Unterscheidung von 2 Typen von Glyceromutase" J. Biol. Chem. 234, S. 1335 (1959)

20 Hevery G. and L. Hahn.: "Rate of Reserval of the acid-soluble Organic Phosphorus Compounds, in die Organs and the Blood of the Rabbit", Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd. 15, Nr. 7 (194o)

21 Krimsky, J.: "Encymatic formation of High Levels of 2,3-Diphosphoglycerate, Isolation and Further Metabolism", J. Biol. Chem. 234, (1959)

22 Kutas, F. and M. Stützel: "The Organic Acid Soluble Phosphate Contents of Mammalian and Avian Erythrocytes at the Beginning of Postnatal Life", Experientia 14, S. 214 (1958)

23 Löhr, G.W. und H.D. Waller: "Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen hämolytischen Anämie" Dtsch. Med. Wschr. 86, S. 27 (1961)

24 Löhr, G.W.: "Nichtsphärocytäre hämolytische Anämien" in "Erbliche Stoffwechselkrankheiten Hrsg. F. Linneweh, S. 328 (1962, München und Berlin, Urban & Schwarzenberg 1962

25 Löhr, G.W.: "Die enzymopenischen Erythropathien" Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 7o (1964)

26 Löhr, G.W.: "Glukosestoffwechsel der roten Blutkörperchen" Series Hämatol. 1o (1965)

27 Löhr, G.W.: "Proc. XI. Congr. Internat. Soc. Hämatol., Sidney 1966

28 Löhr, G.W. und H.D. Waller: "Zellstoffwechsel und Zellalterung", Klin. Wschr. 37, S. 833 (1959)

29 Löhr, G. und H.D. Waller: "Glukose-6-Phosphatdehydrogenase" in H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Weinheim Verlag Chemie 1962

30 Löhr, G.W. und H.D. Waller: "Eine neue enzymopenische Hämolytische Anämie mit Glutathionreduktase-Mangel" Med. Klinik 57, S. 1521 (1962)
31 Löhr, G.W. und H.D. Waller: "Zur Biochemie einiger angeborener Hämolytischer Anämien", Folia Hämatol. N.F. 8, S. 377 (1963)
32 Löhr, G.W., P. Baum und G. Kamm: "Toxische Hämolytische Anämien", Med. Klinik 58, S. 21 (1963)
33 Meyerhof, O. und W. Kiessling: "Über die Isolierung der isomeren Phosphoglycerinsäuren (Glycerinsäure-2-Phosphorsäure und Glycerinsäure-3-Phosphorsäure) aus Gäransätzen und ihr enzymatisches Gleichgewicht", Biochem. Z. 276, S. 239 (1935)
34 Meyerhof, O. und W. Kiessling: "Über den enzymatischen Umsatz der synthetischen Phosphorbrenztraubensäure" Biochem. Z. 280, S. 99 (1935)
35 Nakao, K., W. Takihisa and K. Farnika: "A direct Relationship Between Adenosin-Triphosphate-Level and In-Vivo-Viability of Erythrocytes" Nature 194, S. 877 (1961)
36 Negelein, E. und H. Broenel: "Isolierung eines reversiblen Zwischenproduktes der Gärung", Biochem. Z. 1, S. 135 (1939
37 Oepser, P.: "Phosphoglyceric Acid Mutase" Methods of Enzymology 1, S. 423 (1955)
38 Oepser, P.: "Phosphoglyceric Acid Mutase", Methods of Enzymotoly 1, S. 432 (1955)

39 Prankerd, T.A.J. "Metabolism of the Human Red Cell" Brit. J. Haemotol. 1, S. 131 (1955)
40 Prankerd, T.A.J.: "Revival of Stored Blood with Guanosin", Lancet 1, S. 469, (1956)
41 Prankerd, T.A.J.: "The Nature of the Erythrocyte Defect and the Hämolytic Mechanism in Herederitary Spherocytosis and Nonspherocytic Hämolytic Anämia" in: H. Schubothe "Hämolyse und Hämolytische Erkrankungen", 7. Freiburger Symposion, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer 1959
42 Rapoport, S. and G.M. Guest: "The Decomposition of Diphosphoglycerate in Acidified Blood: its Relationship to the Glycolytic Cycle", J. Biol. Chem. 129, S. 781 (1939)
43 Rapoport, S. and G.M. Guest: "Distribution of Acid-soluble Phosphorus in the Blood-Cells of Various Vertebrates", J. Biol. Chem. 183, S. 269, (195o)
44 Rapoport, S. and G.M.: "Distribiution of Acid-Soluble Phosphorus in the Blood Cells of Various Vertebrates", J. Biol. Chem. 138, S. 269 (1941)
45 Rapoport, S. and W. Luebering: "The Formation of 2,3-Diphosphoglycerate in Rabbit Erythrocytes, the Existence of a Diphosphoglycerate-Mutase" J. Biol. Chem. 183, S. 5o7, (195o)
46 Rapoport, S. and W. Luebering: "Glycerate-2,3-Diphosphatase" J. Biol. Chem. 199, S. 693, (1951)

47 Rapoport, S. und Chr. Nierardt: "Inwieweit verläuft die Glykolyse der Säugetiererythrozyten über 2,3-Diphosphoglycerinsäure?", Biochem.Z. 326, S. 321 (1951)

48 Rapoport, S., Chr. Nierardt und H. Obermann: "Die Bildung von 2,3-Diphosphoglycerinsäure in Muskel und Hefe" Naturwissenschaften 42, S. 73 (1955)

49 Rupp, W.: "Untersuchungen der Phosphorsäureester mit Radiophosphor und Papierionotophorese" Helvet. Paediat. Acta 10, S. 111

50 Schroeter, W.: "Kongenitale nichtspärocytäre Hämolytische Anämie bei 2,3-Diphosphoglyceratmutase-Mangel im frühen Säuglingsalter" Klin. Wschr. 62, S. 1147 (1966)

51 Schroeter, W. und P. Winter: "Zur Bedeutung des 2,3-Diphosphoglycerat Cyclus im Erythrozyten: Beziehung zwischen Methämoglobin- und 2,6-Dichlorphenolindophenol-Reduktion, Glycolyse und 2,3-Diphosphoglyceratbildung" Blut 14, S. 16 (1966)

52 Sutherland, E.W., Th. Posternak and F.Cori: "The Mechanism of Action of Phosphoglucomutase and Phosphoglyceric Acid Mutase" J. Biol. Chem. 179, S. 501 (1949)

53 Sutherland, E.W., Th. Posternak and F. Cori: "Mechanism of the Phosphoglyceric Mutase Reaktion", J. Biol. Chem. 180, S. 153 (1949)

54 Tanaka, K.K., N.N. Valentine and V. Miva: "Pyrnvatkinase Defiency in Herederitary Nonspherocytic Hemolytic Anämie" Blood 19,, S. 267 (1962)

55 Towne, J.C., V.W. Rodwell and S. Grisolia: "Microestimation, Distribution and Biosyntesis of 2,3-Diphosphoglycerate" J. Biol. Chem. 129, S. 781 (1939)

56 Waller, H.D.: "Zur Differentialdiagnose der herederitären nichtsphärocytären Hämolytischen Anämien" Med. Welt S. 2338 (1963)

57 Waller, H.D., G.W. Löhr und M. Tabatabai: "Hämolyse und Fehlen von Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen" Klin.Wschr.35, S. 1022 (1957)

58 Warburg, O. und K. Christian: "Isolierung und Kristallisation des Cofermentes Enolase" Biochem. Z. 310, S. 384 (1941)

59 Whitman, R.: "Potassium movements and Phosphate metabolism in Red Cells", J. Physiol.137, S. 13 P.

Lebenslauf

Als 1. Tochter des Dr. med. Peter Mutschler und seiner Ehefrau Helmtraut, stud.chem., wurde ich am 17. 1. 1941 in Tübingen geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschulen in Gundelsheim und Offenau/Neckar, wo mein Vater als prakt. Arzt tätig war.

1951 wurde ich in den neusprachlichen Zweig des Nikolaus-Kistner-Gymnasiums in Mosbach/Baden eingeschult, ich verließ die Schule 1960 nach bestandener Reifeprüfung.

Das Studium der Medizin begann ich im gleichen Jahr an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg. Dorf blieb ich bis zur 1963 bestandenen ärztlichen Vorprüfung.

Im Wintersemester 1963/64, im 1. Klinischen Semester, kam ich nach Tübingen. Hier ließ ich mir im Febr. 1964 vom damaligen Priv.-Doz., seit 1965 a.o. Professor Dr. med. G.W. Löhr das Thema meiner Dissertation geben. Von Frühjahr 1964 bis Frühjahr 1965

arbeitete ich, auch während der Semesterferien, an den Experimenten zur Bestimmung des 2,3-DPG-Gehalts im menschlichen Erythrozyten.

Im Sommersemester 1965, dem 3. Klinischen Semester, wechselte ich wieder an die Universität Würzburg, am 3o. 5. 1965 heiratete ich dort den cand.med. Michael Schulze-Seyler.

Am 29. 4. 1966 wurde unsere 1. Tochter, Christin Elisabeth, geboren, Ende 1966 hatte ich die ärztliche Prüfung beendet.

Sodann widmete ich mich der Zusammenstellung der experimentellen Ergebnisse und der schriftlichen Formulierung der Dissertation, die ich Juli 1967 Herrn Prof. Dr. med. G.W. Löhr, der inzwischen Ordinarius der 1. Medizinischen Klinik der Universität Marburg geworden war, zur Durchsicht übergab.

Von Juli 1967 bis Juli 1969 war ich als Medizinalassistentin an verschiedenen kleineren Häusern im Landkrais Heilbronn tätig. Außer einigen von Firmen angeregten klinischen Erprobungen von Medikamenten konnte

ich nicht mehr wissenschaftlich tätig werden. Seit der Approbation im Juli 1969 war ich einige Monate als Assistentin auf der geburtshilfl. Station der Priv. Frauenklinik Dr. Weysser, Heilbronn tätig. Sodann übernahm ich gelegentlich Vertretungen von Allgemeinpraxen, z.Z. im Saarland. Mein Ziel ist die Eröffnung einer eigenen Allgemein-Praxis.

H. Schulze-Seyler